

Vol. 23, No. 1

JANUARY, 1936

# THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARI-YAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KATSUJI INOUYE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHICO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEPYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

QP  
501  
J67

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

*Reprinted by*  
**TOA BOOK EXPORTS, INC.**

Tokyo Kosho Kaikan Building  
Kanda Ogawa-cho 3-22, Tokyo  
CABLE: Toaperiodical, Tokyo  
PHONE: Tokyo 291-1448



THE JOURNAL  
OF  
BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARI-YAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KATSUJI INOUYE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHICO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEOYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME 23

TOKYO

1936

COPYRIGHT 1936

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

## CONTENTS TO VOLUME 23.

No. 1, January, 1936.

	Page
TAMAI, Masamitsu. Studies on peroxidase .....	1
SMORODINZEW, I. A. und K. W. BEBESCHIN. Beiträge zur Chemie der Heminthen Mitt. III. Die chemische Zusammensetzung des <i>Taenia Solium</i> .....	19
SMORODINZEW, I. A. und N. W. NIKOLAJEWA. Zur Frage über den Chemismus des Rigor Mortis .....	27
NAGAYA, K., YAMAZOE, S. and NAKAMURA. Glyoxalase and its Co-enzyme. II. On kidney glyoxalase .....	41
SUZUKI, Yoshinosuke. Über die Leberasparaginase .....	57
MURAO, Shizuo. Experimentelle Untersuchungen über das Auftreten der Rachitis. Das Auftreten der Rachitis bei Gallosterin als Lieferquelle des Vitamin A und normaler Proportion des Phosphor- und Calciumgehalts der gebrauchten Salzmixtur .....	71
YOSHIMURA, Hisato. Studies on the nature of the glass electrode potential. I .....	91
NAGAOKA, Hiroshi. On the buffering power of haemoglobin denatured by heat .....	101
ITOH, Ryoji. Spectroscopic studies on purified enzymes. II. Report. On amylase and peroxidase .....	125
KITSUGAWA, Kenichi. Durchblutungsversuche des Magens. XII. Mitteilung. Durchblutungsversuche des Magens mit Ornithin und mit Citrullin .....	131
SASAKI, Takaoki und OTSUKA, Ichiro. Über die d, L-Tolylalanin und ihren bakteriellen Abbau .....	139
SUMIDA, Seiichi. Beiträge zur Kenntnis der Biochemie des Wurmfortsatzes .....	147

No. 2, March, 1936.

MATSUOKA, Yoshimasa. Beiträge zur Kenntnis des sog. gebundenen Blutzuckers. I. Mitteilung. Über das Verhalten des sog. gebundenen Blutzuckers bei der Eiweiss-Fettdiät mit besonderer Berücksichtigung seiner Beziehung zu dem freien Blutzucker .....	161
II. Mitteilung. Über das Verhalten des sog. gebundenen Blutzuckers bei Hunger mit besonderer Berücksichtigung seiner Beziehung zu dem freien Blutzucker .....	171
KITAGAWA, Matsunosuke and TAKANI, Akishige. Studies on a di-amino acid, canavanin. IV. The constitution of canavanin and canalin	181

## Contents

YOSHIMURA, Hisato. Cause of the potential drift of quinhydrone electrode applied to solutions of alkaline buffer, of amino acid or of protein, or to plasma .....	187
SAKAKIBARA, Ihoe und YOSINAGA, Tosio. Über die Bestimmung des Cholins .....	211
ODA, Matazo. Studies on the alkali hydrolysis of diketopiperazines and aniline peptides and its dissociation constants .....	241
KAWAMOTO, Nobuyuki. Fishes as the test subject for biological action of various chemical substances and the studies on the question on the chemical nature of urease .....	267
ITOGH, Ryoji. On the existence of a substance which controls the splitting and synthetic action of lipase. I. Report .....	299
OSHIMA, Gempachi. On $\beta$ -glucuronosidase. III. Report .....	305
YAMAZOYE, Sapuro. Glyoxalase and its co-enzyme. III. The mechanism of the action of glutathione as the co-enzyme of glyoxalase .....	319

No. 3, May, 1936.

YOSHIMURA, Hisato. A new micro-glass electrode and the pH of arterial, venous and capillary blood. (Studies on the blood pH estimated by the glass electrode method. V) .....	335
ISHIKAWA, H. and Y. KOMITA. Enzymic hydrolysis of nucleotides and nucleosides. I. Hydrolysis of purine ribonucleotides .....	351
WATANABE, Kuniechi. Biochemical studies on carbohydrates. XIV. A few modifications of the Zuckerkandl and Messiner-Klebermass method for determination of glucosamine and distribution of glycosaminase among bull tissues .....	365
XV. A modified Zuckerkandl and 'Messiner-Klebermass method for determination of N-mono-acetylglucosamine and its application to biochemical analysis .....	371
SAKAKIBARA, Ihoe. Forschung über die Serumreaktion der Lepra. Über das Reagens einer Fällungsreaktion des Lepraserums .....	377
TSUZUKI, Kazuo. The action of tumour tissue on hexosediphosphoric acid .....	421
SAKAKIBARA, Ihoe. Forschung über die Serumreaktion der Lepra. Untersuchungen über Kephalin als Reagens der Fällungsreaktion des Lepraserums .....	437
SMORODINTSEV, I. A. et P. A. TSYGANNOVA. La propriété "Tampon" des extraits de viande et le coefficient D .....	449
SMORODINTSEV, I. A. et N. N. KRYLOVA. La détermination de la conductibilité électrique et de la tension superficielle des extraits de viande en tant que procédé d'appréciation de la qualité de celle-ci .....	453
NOBUTANI, Fujio. Studies on tyrosinase. II. The action of the potato tyrosinase on various phenolic substances and the effect of addition of various amino compounds on that tyrosinase system .....	455

## STUDIES ON PEROXIDASE.

By

MASAMITSU TAMAI.

(From the Institute of Biochemistry Tokyo Imperial University.  
Director: Prof. S. Kakiuchi.)

(Received for publication, May 1, 1935)

### I. THE EFFECT OF SOME ELECTROLYTES ON THE ACTIVITY OF POTATO PEROXIDASE.

Through the constant research work of many investigators, the nature of peroxidase has become clearer; in so far as it belongs to a group of iron-porphyrin. Experiments have shown that the action of peroxidase is inhibited by the presence of cyanide and sulphide ions (Wieland and Sutter, 1928), while CO has almost no influence upon it (Zeile, K. 1933). Accordingly, the iron is believed to be present in the ferric state. On the other hand some heavy metals show the peroxidase activity, especially in the presence of protein (Bertrand, G. 1897; Trillat, M. A. 1904; Kimura, T. 1924; Kuhn, R. and Braun, L. 1926; Cook, S. F. 1927; Shibata, Y. and Shibata, K. 1933, 1934). In the same time the influence of the heavy metal ions on the peroxidase was studied by many authors (Bertrand, G. 1897; Bach, A. 1910; Smirnow, A. J. 1925; Andreiychewa, M. 1930; Getchell, R. W. 1931). These observations were obtained for the greater part from a study of impure or pure preparations of peroxidase, or in the model experiment composed of proteins and heavy metals.

To get a clearer idea of the nature of peroxidase, however, it seems to be more desirable to follow the change of behaviour of peroxidase either with the addition or with the depletion of some supposed ingredients in the course of purification. In the following will be found some experiments conducted with this object in mind.

*I. Preparation of Peroxidase.*

The three preparations of peroxidase were made for the experiment. An impure baryta extract, an elute obtained by the Willstätter method (Willstätter and Stoll, 1918) and the electrodialysant of the latter. The first baryta extract was obtained as follows. Five kilos of sliced potatoes were placed under tap water for 4-8 days, put into 10 liter, of 0.4% oxalic acid for 4-6 hours and passed through a meat chopper. 500 cc. of halfly saturated baryta solution (at 20°C) were then added, well mixed and pressed off after half an hour. The extract obtained here remained either slightly acidic or neutral and was thrown away. Another 600 cc. of the saturated baryta solution were added and again pressed out after half an hour. The second extract was slightly alkaline and immediately the superfluous baryta was precipitated by a current of carbon dioxide. The filtrate from this barium carbonate precipitate was called impure baryta extract.

*The elute obtained after adsorption.* The baryta extract above described was added with a little less than equal volume of alcohol to obtain a concentration of 40% of the latter. The precipitate was thrown off and after adjusting the pH of the solution at 7.5 by means of sodium carbonate, the filtrate was added with an amount of aluminium hydroxide suspension sufficiently to adsorb about 70% of peroxidase, then lightly shaken and centrifuged half an hour later. The precipitate was washed once with an equal amount of distilled water. Then the distilled water was added to the washed adsorbate until the whole volume of the mixture equaled the original baryta solution mixture. After the lapse of half an hour the mixture was centrifuged and the elute thus obtained used as the second preparation.

*Preparation obtained by electrodialysis.* The elute obtained as mentioned above was put into a middle chamber of Pauli's electrodialysor (Pauli, 1924), and electrodialysed through collodioned parchment under a voltage low at first, increasing steadily until reaching a 500 voltage. The current intensity decreased under 10 milliampere. In the course of 4 hours the conductivity de-

creased to about twice that of distilled water, and during a further 24 hours decreased slowly to the value of distilled water.

## *II. Estimation of Peroxidase Activity.*

For the estimation of peroxidase activity, Willstätter's purpurogallin method (Willstätter and Stoll, 1918; Willstätter and Weber, 1926) was mainly followed and performed as follows. To the 197 cc. of acetate buffer solution (pH 6.4) warmed in a thermostat at 25°C were put 0.5 gm. of pyrogallol and 1 cc. of 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 cc. of the electrolyte to be tested or 1 cc. of distilled water (as control) was then added, well mixed and immediately 1 cc. of peroxidase solution was added and mixed. Exactly after 5 minutes the action of the enzyme was checked by the addition of 5 cc. of sulphuric acid (1:4) and the purpurogallin produced was extracted with 35 cc. of ether. The colour of the ethereal extract was compared with the standard solution containing 100 mg of purpurogallin in 1 liter of ether. The activity of enzyme was taken as 100 when the ether extract obtained as above showed the same colour intensity as the standard solution.

## *III. The effect of the presence of various cations and anions on the activity of peroxidase.*

Various kinds of ions as Fe<sup>+++</sup>, Cu<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup>, CN<sup>-</sup>, CNS<sup>-</sup>, S<sup>2-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, oxalate and citrate were added to the reaciton mixture at varying concentration and the effect of their presence on the activity of peroxidase of three different purities was compared. The results are shown in Table I and figure 1.

As can be seen from the table and figure almost all kinds of salt retard the activity of peroxidase, and the degree of retardation increases with the salt concentration. However, the exception is observed by the case of copper ion on all three preparations and by the case of iron ion on electrodialysed elute and the activation of enzyme was clearly observed. In the case of baryta extract and the elute from aluminium hydroxide adsorbate, the addition of iron salt always retards the enzyme activity. The increase of the

TABLE I.  
a) The Baryta Extract. (control = 100.0)

Cone. of salt added (mol.)	FeCl <sub>3</sub>	CuCl <sub>2</sub>	MnCl <sub>2</sub>	BaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>
10 <sup>-1</sup>					74.5
5.10 <sup>-2</sup>					77.5
10 <sup>-2</sup>				68.6	84.8
10 <sup>-3</sup>				90.7	91.0
10 <sup>-4</sup>			93.0	97.5	98.0
5.10 <sup>-5</sup>			94.3	—	—
10 <sup>-5</sup>	92.9	108.0	98.0	99.7	100.1
5.10 <sup>-6</sup>	98.7	110.5	96.3	—	—
2.10 <sup>-6</sup>	99.2	106.7	98.9	—	—
10 <sup>-6</sup>	98.5	103.0	100.1	100.3	99.9
5.10 <sup>-7</sup>	99.1	100.1			
2.10 <sup>-7</sup>	100.3				
10 <sup>-7</sup>	100.2				

b) The Elute from aluminium hydroxide Adsorbate. (control = 100.0)

Cone. of salt added (mol.)	FeCl <sub>3</sub>	CuCl <sub>2</sub>	MnCl <sub>2</sub>	BaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	KCN	KCNS	K <sub>4</sub> FeCy <sub>6</sub>
10 <sup>-1</sup>						64.3			
10 <sup>-2</sup>						87.8		43.	
5.10 <sup>-3</sup>						—		61.	
2.10 <sup>-3</sup>						—		77.	
10 <sup>-4</sup>			86.0	86.7	94.6		84.5	5	
5.10 <sup>-4</sup>			—	—	—		88.8	—	
2.10 <sup>-4</sup>			—	—	—		91.4	—	
10 <sup>-5</sup>		92.0	92.5	92.8	99.3	0.	94.1	75.7	
2.10 <sup>-5</sup>	103.1	—	—	—			100.0	—	
10 <sup>-5</sup>	85.2	118.0	95.3	96.0	95.0	5.			94.4
5.10 <sup>-6</sup>	—	120.0	—	—	—				
2.10 <sup>-6</sup>	—	115.5	—	—	—				
10 <sup>-6</sup>	90.6	117.0	96.0	101.2	99.6		42.0		
5.10 <sup>-7</sup>	97.4	108.1	99.3						
2.10 <sup>-7</sup>	98.5	100.1	97.7						
10 <sup>-7</sup>	99.6	99.7	99.0				58.0		
10 <sup>-8</sup>							82.8		
10 <sup>-9</sup>							94.7		
10 <sup>-10</sup>							101.0		

	NaCl	NaNO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na. oxalate	Na. citrate
10 <sup>-2</sup>	99.0	102.5	98.8	98.0	99.1

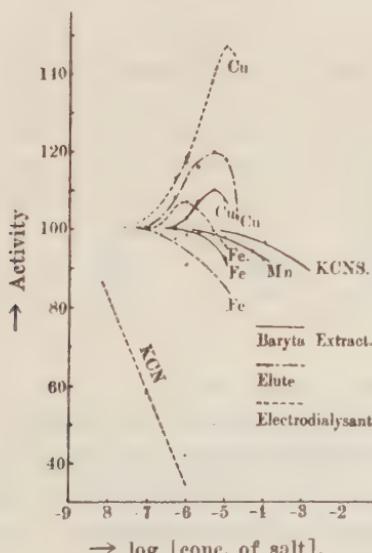
## e) The Electrodialysant. (control = 100.0)

Conc. of salt added (mol.)	FeCl <sub>3</sub>	CuCl <sub>2</sub>	MnCl <sub>2</sub>	BaCl <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	KCN	KCNS	K-S
10 <sup>-2</sup>						98.3		43.5	
10 <sup>-3</sup>				94.6	94.8			83.3	
5.10 <sup>-4</sup>			99.0	—	—			—	
10 <sup>-4</sup>			—	99.3	99.6			92.6	
10 <sup>-5</sup>	95.9	147.0	101.0	100.3	100.8		0		
3.10 <sup>-6</sup>	100.0	—	100.0				—		
10 <sup>-6</sup>	107.0	118.0	99.0				30.0		77.0
5.10 <sup>-7</sup>	—	113.0	—				—		
3.10 <sup>-7</sup>	100.3	—	99.0				—		
10 <sup>-7</sup>	102.0	103.0					—		
10 <sup>-8</sup>							82.0		
10 <sup>-9</sup>							95.7		

	NaCl	NaNO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na. oxalate	Na. citrate
10 <sup>-2</sup>	100.0	100.0	101.2	97.0	101.5
10 <sup>-3</sup>		101.0	103.0	98.5	100.0

Fig. 1.



peroxidase activity in the case of copper salt addition to all the three preparations, and in the case of iron salt to electrodialysant began always to decrease again at  $3 \times 10^{-6}$ — $10^{-5}$ . The effect of KCN is also especially to be mentioned, their effect being noticeable already at the concentration of  $10^{-9}$  and the activity being entirely suppressed by the presence of KCN at  $10^{-5}$  (mol). This prominent effect of copper, iron and cyanide ions on the activity of peroxidase of different preparations clearly indicates the vivid participation of heavy metal ion on the activity of peroxidase.

#### *IV. The amount of iron contained in three different preparations.*

The result of the preceding experiments led us to determine the amount of total and ionic iron of these three preparations in order to find if any relation existed between these amounts and the activity of peroxidase. In table II the amount of total iron and ionic iron contained in each peroxidase preparation shows the activity 100 mentioned in the section of estimation of enzymic activity.

TABLE II.

The amount of total and ionic iron contained in the preparation of the same (= 100.0) activity.

Kind of preparations	Solid	Total iron	Total iron	Ionic iron	Ionic iron
	mg	mg	Solid	mg	Solid
Baryta Extract	0.90	0.0004	0.00045	0.00005	0.00006
Elute	0.38	0.00025	0.00066	0.00002	0.00005
Electrodialysant	0.26	0.0003	0.0012	0.0	0.0

This result shows us the fact that the ionic iron is far less important as a factor in peroxidase activity than organic irons. The increase of peroxidase activity by addition in case of electrodialysant preparation, however, suggests to us the presence of some mechanism involving the participation of heavy metal ions.

*The effect of Cyanide.*

The addition of cyanide ion inhibits the peroxidase activity in a very dilute solution. In our case, for instance, the inhibition is complete in  $10^{-5}$  mol, and even in  $10^{-9}$  mol, is about 5 per cent of inhibition observable. As this inhibiting action of cyanide is generally believed to be due to its behaviour against the iron component of peroxidase, I have examined the degree of inhibition of peroxidase activity by the presence of cyanide stoichiometrically. The inhibiting action of cyanide does not show its full activity at once and proceeds rather slowly when its concentration is weak. I therefore determined the activity of peroxidase immediately, and at 1, 2, 3, 4, 6 and 8 hours consecutively after the addition of cyanide of various concentration. The results are shown in Table III and figure 2.

TABLE III.

Cone. of KCN	Kind of preparations	Time of action of KCN (hour)					
		0	1	2	4	6	8
$10^{-6}$	Baryta Extract	54.5	47.0	—	43.7	45.0	—
	Elute	—	—	—	—	13.0	—
	Electrodialysant	25.0	19.3	—	15.5	13.0	—
$10^{-7}$	Baryta Extract	76.5	61.5	58.0	52.0	—	54.7
	Elute	45.5	41.5	37.3	32.5	—	32.0
	Electrodialysant	50.5	35.5	30.0	30.5	—	25.5
$10^{-8}$	Baryta Extract	100.0	95.7	84.7	86.2	—	83.0
	Elute	95.0	73.0	70.5	63.6	—	63.0
	Electrodialysant	86.2	64.6	60.4	58.7	—	54.5
$10^{-9}$	Baryta Extract	100.0	101.0	—	—	100.0	—
	Elute	—	—	—	—	81.0	—
	Electrodialysant	97.5	93.2	—	80.7	—	70.3

As will be seen in the table and figures, the inhibiting action attains its full activity after 8 hours. When we plot the activity concentration curve as shown in figure 3, the inhibition of cyanide

Fig. 2.

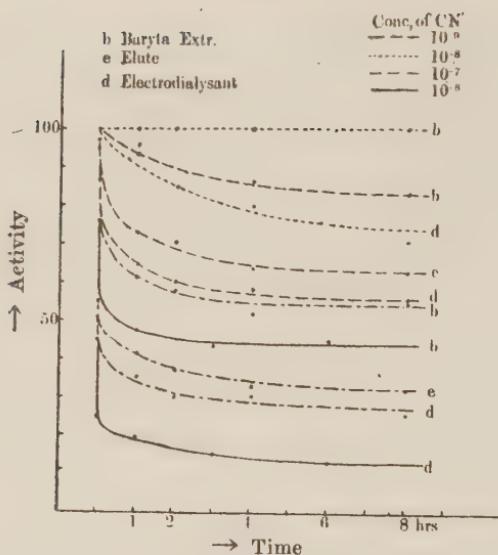
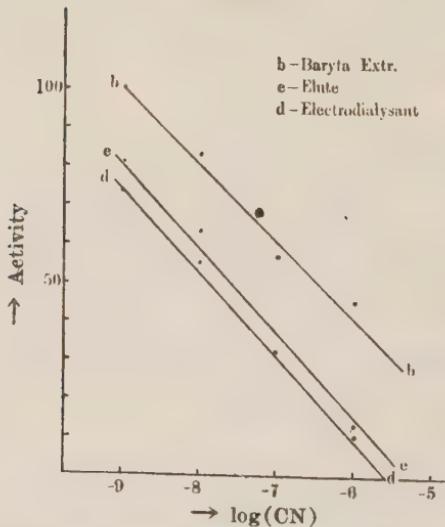


Fig. 3.



seems to be proportional to the logarithm of its concentration, although the total amount of iron present in peroxidase does not vary very much among three preparations. The resistance of the

enzyme to cyanide seems to be larger, the larger the amount of iron contained in the preparation. Accordingly the effect of the addition of iron on the inhibiting action of cyanide was studied. The ferric salt was added to the concentration of  $10^{-5}$  and  $10^{-6}$ , directly before the addition of cyanide at  $10^{-7}$ . The inhibiting action of cyanide was not influenced at all by the presence of iron at these concentrations. When iron salt and cyanide are mixed together beforehand and added to the enzyme solution the inhibiting action of cyanide was just the same as if there were no iron salt present. These results suggest to us clearly that inorganic iron plays no part with the cyanide inhibiting action on the peroxidase. The addition of copper salt, on the other hand, shows the influence on the inhibiting action of cyanide. As the table IV indicates, copper seems to counteract the action of cyanide.

TABLE IV.  
Protecting and Recovering Action of Copper and Iron ion  
upon the Inhibition of Peroxidase by KCN.

Peroxidase activity (=100.0) was inhibited by KCN of  $10^{-7}$  mol to 48.0.  
i.e. pCy = 48.0.

Exp. No.	Mode of experiment	Concentration of reagents				Peroxidase activity
		pFe	pCu	pCN	Hemin	
1	CuCl <sub>2</sub> was added to peroxidase, and then KCN added	6	7			99.5
		7	7			85.4
		8	7			65.2
2	KCN was added to peroxidase, and then CuCl <sub>2</sub> added	5	7			64.4
		6	7			65.2
		7	7			58.5
3	KCN and CuCl <sub>2</sub> were mixed together and added to peroxidase	6	7			99.0
		7	7			56.6
		8	7			47.6
4	FeCl <sub>3</sub> was added to peroxidase, and KCN added	5		7		46.5
		6		7		51.3

5	KCN and FeCl <sub>3</sub> were mixed toge- ther, and added to peroxidase	5		7		45.3
		6		7		49.3
6	Hemin was added to peroxidase and KCN added			7	6	73.4
				7	7	65.2
				7	8	56.7
7	KCN was added to peroxidase, and Hemin added			7	9	49.7
7				7	7	60.4

## II. PEROXIDASE ACTIVITY OF CRUDE POTATO EXTRACT.

In the preceding sections the effect of cyanide, copper and iron salt on the activities of variously purified potato peroxidase was studied. To get some idea of the conditions prevailing within fresh potatoes in regard to peroxidase activity, some experiments were performed with crude fresh potato extract. As we all know the fresh cut surface of a potato becomes coloured after a little while, and the colour deepens by the oxidation of catechol bodies. In the following, the peroxidase activity of crude potato extract was studied partly with a preparation prepared directly from fresh material and partly with extract made of potato slice, dialysed under tap water. The dialysis method was used to wash out any soluble and dialysable matter from the tissue.

### I. The peroxidase activity of fresh potato extract.

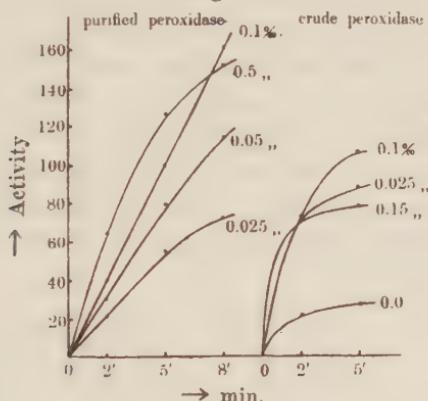
About 10 gm. of fresh potato were finely ground with the same amount of water and centrifuged. 1 cc. of the supernatant turbid solution was mixed with 0.2 gm. of pyrogallol, 1 cc. of 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 1 cc. of 1N acetate buffer at pH 6.4 and the amount of purpurogallin was determined just as mentioned in the foregoing paper. The amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was found optimum when concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was taken as 2% as used in the case of purified peroxidase. The result is shown in the Table V and Fig. 4.

As can be seen from the table the peroxidase activity of fresh potato soon begins to decay. In this fresh preparation the oxidation of pyrogallol is carried out without the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

TABLE V.

$H_2O_2$ 1 c.c. of	0	0.5%	1%	1.5%	2%	3%	6%	15%
Reacting Time	2'	22.5	73.8	71.0	68.1	74.0	74.0	—
5'	28.8	89.2	92.3	94.2	108.0	80.0	53.0	37.4
Ratio 5'/2'	1.3	1.2	1.3	1.4	1.5	1.1	—	—

Fig. 4.



and this oxidase activity amounts to  $\frac{1}{4}$  to  $\frac{1}{2}$  parts of oxidation in presence of  $H_2O_2$ . When we let the preparation act on pyrogallol in absence of  $H_2O_2$  for a little while, and later add  $H_2O_2$  to the system, the amount of purpurogallin remained the same as when we added  $H_2O_2$  from the beginning, as Table VI indicate.

TABLE VI.

$H_2O_2$	(-)	(-)	(+)	(-) + (+)
Time	2'	4'	2'	2' + 2'
Activity	31.4	37.0	63.2	65.8*

shows the activity of enzyme preparation in present of  $H_2O_2$  for 2 minutes after the oxidase action for 2 minutes.

This fact tells us that the oxidase action and the peroxidase action carry on independently of each other.

## II. The peroxidase activity of the extract of dialysed potato.

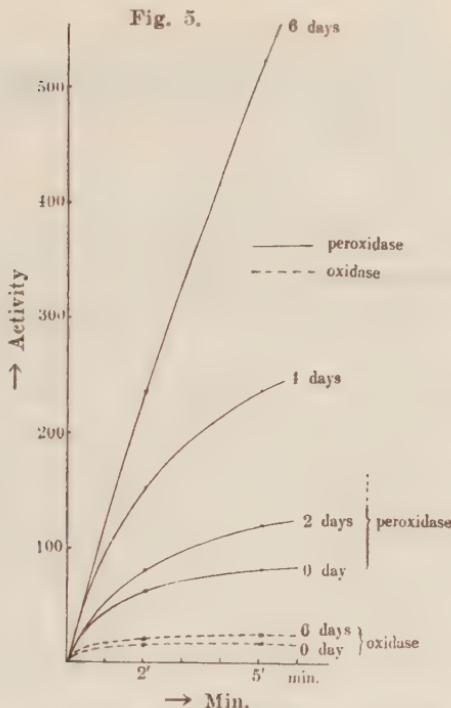
That the slowing down of the peroxidase activity shown in the foregoing section is not due to the destructive action of  $H_2O_2$

on the peroxidase is clear from the activity curve of peroxidase, as that which has been treated from 2 to 5 minutes still retains entirely a similar activity curve as that of non-treated peroxidase. The baryta extract of fresh potato and the extract prepared by the treatment either of oxalic acid or of alcohol shows an entirely similar course of activity change, as the water extract of fresh potato described under section II. The purifying process by adsorption and elution against  $\text{Al}(\text{OH})_3$  showed no better results. When, however, the slices were dialysed under the tap water and the peroxidase activity of extract made at certain intervals were examined, an entirely distinct change in activity, curve was observed. (cf. Oparin, A. and Bach, A. 1923, 1924; Oparin, A. 1923; Willstätter, R. 1921; Willstätter, R.; Pollinger, A. and Weber, H. 1928). The results are shown in Table VII and Fig. 5.

TABLE VII.

Time of Dialysis	$\text{H}_2\text{O}_2 (-)$		$\text{H}_2\text{O}_2 (+)$	
	2'	5'	2'	5'
0	14.0	17.1	63.3	81.7
1 day	14.8	16.5	60.9	77.0
2	15.3	17.8	81.8	121.8
4	15.2	16.5	154.0	238.
6	22.0	24.7	235.	522.

As the table and curve indicate the peroxidase activity increased greatly in the lapse of time, and the time activity curve becomes almost straight after 6 days (temperature of tap water being between  $15^\circ$  and  $20^\circ\text{C}$ ) of dialysis. The slices became brown in color during this time, and when prolonged dialysis against distilled water were made, which caused the same change in colour of slices, the same change in the activity curve was observed. Not only this, the mere exposure of wetted slices in the air caused also the same change in colour and activity curve. Slices placed in vacuo or in water poorly aerated, remained as the fresh potato. Treatment with  $\text{H}_2\text{O}_2$  merely serve to destroy enzymes. All of these experiments tell us that oxidation by the



presence of oxygen, can alone cause the mentioned change in the activity. At the same time about  $\frac{1}{3}$  to  $\frac{1}{2}$  of proteine nitrogen contained in slices, changes to residual nitrogen.

When I was examining these relations Richter (1934) reported that the action of the catechol oxidase prepared from fresh potato soon stops after 2 minutes of its action, and that this inactivation was probably due to the inhibiting action of oxidation product of catechol, i.e. *o*-quinone, as this inactivation is prevented in the presence of *M/20* aniline, *M/10* glycine or *o*-phenylene diamine, all of which are said to combine with *o*-quinone. I have therefore re-examined this point. I was, however, unable to verify his statement.

*III. The effect of the addition of potassium cyanide on the activity of oxidase and peroxidase of fresh and dialysed potato.*

Next I compared the behaviour of fresh oxidase, fresh

peroxidase and dialysed peroxidase against the addition of potassium cyanide and found the dialysed peroxidase the most sensitive, while fresh oxidase was least, as Table VIII and IX and Fig. 6 illustrate this point.

TABLE VIII.

The inhibition of the oxidase and peroxidase activity of the extract from fresh and dialysed potato upon the addition of  $10^{-4}$  mol of KCN.

	Time (min.)	Oxidase activity			Peroxidase activity		
		Control	KCN	Residual activ. %	Control	KCN	Residual activ. %
Fresh	2'	42.6	25.5	60	82.0	32.3	40
	5'	43.5	25.3	58	107.8	43.4	40
Dialysed for 2 days	2'	17.5	8.2	47	113.0	14.9	13
	5'	23.4	11.7	50	208.5	22.6	11
Dialysed for long time	2'	9.3	4.6	50	97.0	7.6	7.8
	5'	13.0	6.3	49	208.0	11.7	5.6

TABLE IX.

The inhibition of the oxidase and peroxidase activity of extract from fresh and dialysed potato upon the addition of various concentrations of KCN (reacting time being 2 min.)

Conc. of KCN (mol)		0	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
Fresh potato	oxidase	8.9	8.9	9.0	8.7	4.0
	peroxidase	39.7	37.8	30.8	19.4	9.4
Dialysed potato	oxidase	7.0	—	6.8	6.8	4.0
	peroxidase	60.0	54.0	40.0	18.0	7.9

The inhibition of the oxidase and peroxidase activity of extract from fresh and dialysed potato upon the addition of  $10^{-4}$  mol of KCN.

The addition of fresh potato extract hardly protects the dialysed potato extract against the action of potassium cyanide as is shown in Table X.

TABLE X.

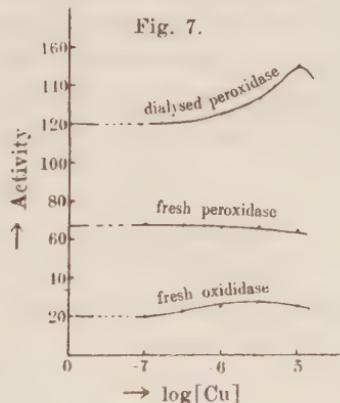
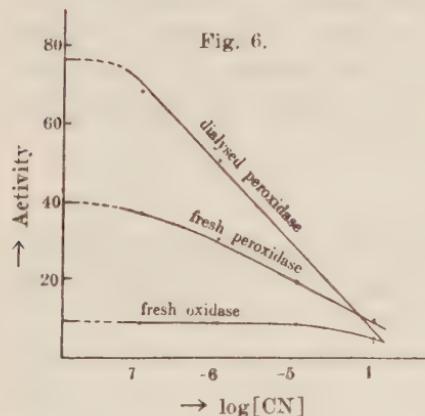
Cone. of KCN	Fresh potato Extr. 1 e.e. → 1 e.e. + 1 e.e. ← Dialysed potato Ex. 1 e.e.						
	0	$10^{-5}$	$2.10^{-5}$	$2.10^{-5}$	$2.10^{-5}$	$10^{-5}$	0
Residual activ.	80.0	58.0	52.6	91.7	40.7	58.5	294.

The activating effect of copper was then examined with fresh potato extract and with extract of dialysed potato. The result is shown in Table XI and Figure 7.

TABLE XI.

The effect of  $\text{Cu}^{++}$  on the activity of the oxidase and the peroxidase of fresh potato and the peroxidase of dialysed potato.

Cone. of Cu (mol)	0	$10^{-7}$	$3.10^{-7}$	$10^{-6}$	$3.10^{-6}$	$10^{-5}$
Oxidase activ.	200.0	19.7	22.7	24.5	27.8	24.7
Fresh perox. activ.	68.0	67.5	66.7	65.7	65.7	64.5
Dialysed perox. activ.	119.0	—	—	125.0	133.4	149.5



## DISCUSSION.

When we compare the behaviour of peroxidase of fresh potato extract toward KCN and copper salt with that of purified peroxidase, it becomes manifest that the former resists far more the

action of potassium cyanide, and is entirely non-reactive to copper ion. Many days storage of fresh potato slices in the presence of oxygen and water increases, however, the activity of peroxidase enormously, and allows it to acquire the character of purified peroxidase in regard to its behaviour toward KCN and copper salt. During the storage a part of protein which is precipitable by tungstic acid changes to residual nitrogen. Extract freshly prepared and that prepared after many days storage with free access to oxygen, contains the same amount of nitrogen, and the difference lies only in the relative amount of proteinic nitrogen and residual nitrogen. The acquirement of sensitivity toward KCN and of activation by copper salt is here obtained only by the change of proteinic nitrogen to residual nitrogen. On the other hand we have seen above that the action of peroxidase of fresh potato extract soon exhausts itself, while that of moist potato slices stored in air, persists for a longer time resembling purified peroxidase. Equipped with these facts we can not help thinking that fresh peroxidase is accompanied with some "Begleitstoffe" of proteic nature which hinders the action of peroxidase on the one hand and protects against the action of KCN on the other. Copper salt also remains inactive in the presence of these accompanying impurities. The role played by these accompanying impurities awaits further elucidation.

#### RESUMÉ.

1. The purified peroxidase contains only undissociable iron.
2. The addition of iron and manganese salt to the purified peroxidase does not promote its action.
3. The action of the purified peroxidase is inhibited readily by KCN and promoted by copper salt, while the impure enzym extract is far less sensitive to both these substances.
4. The activity of potato peroxidase is enormously accelerated by the storage of plant tissue in the presence of oxygen and water. The behaviour of activated peroxidase toward KCN and copper ion is similar to that of purified peroxidase obtained by the Willstätter method.

5. The "Begleitstoffe" which hinders the long endurance of peroxidase activity can not be removed by the mere adsorption and elution method. The oxydation by atmospheric oxygen seems to be necessary for the removal of these accompanying impurities.

## REFERENCES.

Andreitchewa, M. (1930): Bull. soc. chim. biol., **12**, 44.  
 Bach, A. (1910): Ber., **43**, 366.  
 Bertrand, G. (1897): Bull. soc. chim. Paris, **17**, 619; C. r. **124**, 1032, 1356.  
 Cook, S. F. (1927): J. gen. physiol., **10**, 289.  
 Elliott, K. A. C. and Keilin, D. (1934): Proc. soc. London, **B 114**, 210.  
 Getchell, R. W. (1931): Jl. biol. chem., **91**, 419.  
 Kimura, T. (1924): Jl. biochem., **3**, 211.  
 Kuhn, R., Hand, D. B. and Florkin, M. (1931): Z. physiol. chem., **201**, 255.  
 Kuhn, R. and Braun, L. (1926): Ber., **59**, 2370.  
 Oparin, A. (1923): Bioch. Z., **134**, 190.  
 Oparin, A. and Bach, A. (1923, 1924): Bioch. Z., **134**, 183, '23; **148**, 476, '24.  
 Pauli, Wo. (1924): Bioch. Z., **152**, 355.  
 Richter, D. (1934): Bioch. Jl. **28**, 901.  
 Shibata, Y. and Yamazaki, K. (1933, 1934): Jl. chem. soc. Japan, **54**, 1207, '33; **55**, 693, '34.  
 Smirnow, A. J. (1925): Bioch. Z., **155**, 1.  
 Trillat, M. A. (1904): Bull. soc. chim., 2<sup>e</sup> Série, **31**, 807, 811.  
 Wieland, H. and Sutter, H. (1928): Ber., **61 B**, 1060.  
 Willstätter, R. and Stoll, A. (1918): Ann., **416**, 21.  
 Willstätter, R. and Pollinger, A. (1923): Ann., **430**, 269.  
 Willstätter, R. and Weber, H. (1926): Ann., **449**, 156.  
 Willstätter, R., Pollinger, A. and Weber, H. (1928): Willstätter's Untersuchungen der Enzyme I, 517.  
 Zeile, K. (1933): Ergebnisse d. Physiol., **35**, 498.



## BEITRÄGE ZUR CHEMIE DER HEMINTHEN

Mitt. III.<sup>1)</sup>

### Die Chemische Zusammensetzung des *Taenia Solium*.

VON

I. A. SMORODINZEW UND K. W. BEBESCHIN.

(Aus dem *Chemotherapeutischen Sector des Tropeninstituts in Moskau.*)

(Eingegangen am 10. Mai 1935)

Da der bei Schweinen vorkommende Bandwurm *Taenia Solium* in Moskau viel seltener zu finden ist, als *Taenia saginata*, so haben wir viel Zeit verwenden müssen um Material zu den Analysen zu sammeln. Wir haben 31 Musterserien dieses Wurmes ebenso und nach denselben Methoden untersucht wie es in unserer ersten Mitteilung beschrieben wurde. (I. A. Smorodinzew u. W. Bebeschin, 1933).

Das Durchschnittsergebnis unserer Analysen ist in Tabelle I gezeigt.

TABELLE I.

Art des Wurmes	Wasser %	Trockenrückstand %	Organ. Stoffe %	Gesamtstickst. gehalt %	Asche %	Lipoide %
Taenie solium	91.29	8.71	8.23	0.65	0.53	1.41
Taenie saginata	87.82	12.18	11.55	0.64	0.65	1.36

Wie aus Tabelle I hervorgeht enthält der *Taenia solium* durchschnittlich ebensoviel Gesamtstickstoff und Lipoiden wie die *Taenia saginata*, jedoch im Wassergehalt und Trockenrückstand sind bedeutende Unterschiede zu bemerken, wobei die organischen Stoffe um 40% und die Mineralstoffe um 23% weniger sind, wie bei *Taenia saginata*.

1) II Mitt. I. A. Smorodinzew und K. W. Bebeschin Biochem. Z., esd, 276, 271, 1935.

Dem Wassergehalt und dem Trockenrückstand (E. Weinland, 1901) nach steht der *Taenia solium* näher dem *Taenia expansa* (90,9–9,1). Tabelle II gibt uns ein Bild über die Schwankungsgrenzen in der Zusammensetzung einzelner Würmer.

TABELLE II.

Die Faktoren	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Schwankungen in %
Trockenrückst.	5.92	12.73	8.71	-32 bis -46
Organische Stoffe	5.60	11.74	8.23	-32 „ -42
Asche	0.29	1.03	0.53	-45 „ -95
Gesamtstickstoffgehalt	0.47	0.93	0.65	-30 „ -43
Lipoide	0.85	2.77	1.41	-40 „ -97

Allen Angaben nach sind die Schwankungen in der chemischen Zusammensetzung der *Taenia solium* bedeutend grösser als bei *Taenia saginata*, wobei die grössten Abweichungen von der Durchschnittsgrösse bei beiden Würmern auf Asche und Lipoiden fällt.

## ZUSAMMENFASSUNG.

- 1) Dem Gesamtstickstoffgehalt und den Lipoiden nach unterscheidet sich der *Taenia solium* nicht vom *Taenia saginata*.
- 2) Die *Taenia saginata* enthält durchschnittlich bis 40% mehr organische Stoffe und bis 23% mehr Mineralteile im Vergleich mit der *Taenia solium*.
- 3) Die individuellen Schwankungen der chemischen Zusammensetzung sind beim *Taenia solium* grösser als beim *Taenia saginata*.

## LITERATUR.

Smorodinzew, I. A. u. K. W. Bebeschin (1933): Biochem. Zeits., **261**, 176.  
 Weinland, E. (1901): Z. Biologie, **41**, 66.

## BEITRÄGE ZUR CHEMIE DER HEMINTHEN

Mitt. IV.<sup>1)</sup>

### Die Chemische Zusammensetzung des *Diphyllobotrium latum*.

VON

I. A. SMORODINZEW UND K. W. BEBESCHIN.

(Aus dem Chemotherapeutischen Sector des Tropeninstituts in Moskau.)

(Eingegangen am 10. Mai 1935)

Als dritter Vertreter der flachen Würmer haben wir nach dem von uns angenommenen Plan (I. A. Smorodinzew, K. W. Bebeschin u. P. I. Pawlowa, 1933) die chemische Zusammensetzung des *Diphyllobotrium latum* untersucht. In Tabelle I geben wir das Durchschnittsergebnis unserer Untersuchungen von 24 Serien des breiten Bandwurmes und vergleichen sie mit den entsprechenden Ergebnissen, die wir beim Studium der *Taenia saginata* und der *Taenia solium* erhalten haben.

TABELLE I.

Art des Wurmes	Wasser %	Trocken-rückstand %	Organ. Stoffe %	Gesamt-stickst. gehalt %	Asehe %	Lipoide %
<i>Diphillabetrium latum</i>	90.50	9.04	9.50	0.91	0.43	1.54
<i>Taenia solium</i>	91.29	8.23	8.71	0.65	0.53	1.41
<i>Taenia saginata</i>	87.82	11.55	12.18	0.64	0.65	1.36

Wie zu ersehen ist, sind *Diphyllobotrium latum* nach dem Trockenrückstand und den organischen Stoffen näher dem *Taenia solium* als dem *Taenia saginata*. Der Gesamtstickstoffgehalt beim *Diphyllobotrium latum* übersteigt um 40% denjenigen des *Taenia*

1) III Mitt. I. A. Smorodinzew und K. W. Bebeschin, diese Z. Biochem. Zs. Bd., 261, 176, 1933.

solum, hingegen ist der Aschegehalt um 20% kleiner.

Die Schwankungen des Fettinhalts sind unbedeutend und unterscheiden sich nicht mehr als um 10%. Abweichungen der Durchschnittsnormen sind bei den drei Wurmarten unbedeutend, mit Ausnahme des Gesamtstickstoffgehaltes und der Asche bei *Diphyllobotrium latum*.

Was die Höhe der Schwankungen der chemischen Zusammensetzung einzelner Würmer anbetrifft, so übersteigt die *Diphyllobotrium* die bei den anderen Arten von flachen Würmern (Tabelle II).

TABELLE II.

Die Faktoren	Minimum	Maximum	Durchschnitt	Schwankungen in %
Trockenrückstand	3.39	19.01	9.50	- 64 bis - 100
Organische Stoffe	3.02	17.86	9.04	- 67 „ - 98
Asche	0.22	1.15	0.43	- 50 „ - 170
Gesamtstickstoffgehalt	0.63	1.52	0.91	- 30 „ - 67
Lipoide	1.09	2.68	1.54	- 30 „ - 74

## ZUSAMMENFASSUNG.

- Dem Gesamtgehalt der Lipoiden nach unterscheiden sich alle drei Arten der flachen Würmer wenig von den Durchschnittsnormen.
- Im Vergleich mit *Taenia solium* und *Taenia saginata* unterscheidet sich *Diphyllobotrium* durch einen bedeutend höheren Gesamtstickstoffgehalt und kleiner Mengen Mineralstoffe.
- Die individuellen Schwankungen der chemischen Zusammensetzung sind beim *Diphyllobotrium latum* bedeutend schärfer ausgeprägt.

## LITERATUR.

Smorodinzew, I. A., Bebeschin, K. W. u. Pawlowa, P. I. (1933):  
Biochem. Zs., 261, 176.

## BEITRÄGE ZUR CHEMIE DER HELMINTHEN

### Mitt. V.

#### Die Chemische Zusammensetzung der *Ascaris Lumbricoides*.

VON

I. A. SMORODINZEW UND K. W. BEBESCHIN.

(Aus dem chemischen Sector des Tropeninstituts, Moskau.)

(Eingegangen am 10. Mai 1935)

Zur Frage der chemischen Zusammensetzung der flachen Würmer finden wir in der Literatur beinahe keine Angaben. An Spulwürmern sind einige Forschungsarbeiten durchgeführt worden und daher besitzen wir einiges Material zum Vergleich.

Unterschiedlich von den hermaphroditen, flachen Würmern haben die Spulwürmer ein geteiltes Geschlecht. Deshalb haben wir nach unserer Art (I. A. Smorodinzew, K. W. Bebeschin u. P. I. Pawlowa 1933) den chemischen Bestand einzeln, bei männlichen und weiblichen Individuen des *Ascaris lumbricoides* durchgeführt und geben das Durchschnittsergebnis von 40 Serienversuchen an Askariden in Tabelle I.

TABELLE I.  
Gehalt in %.

Arten der Würmer	Wasser	Trocken. Rückst.	Organ. Stoffe	Asche	Ges. Stickstoffgeh.	Lipoiden
Weibl. Askarid.	80.29	19.71	18.93	0.79	1.46	1.14
Mannl. „	80.60	19.40	18.63	0.77	1.58	1.23
Durchschnittl. nach Weinland (1902)	80.45	19.55	18.78	0.78	1.52	1.18
	78.50	21.5	—	—	1.69	1.46
	80.10	19.9	—	—	1.90	1.51
Durchschnittl. für flache Würmer	89.86	10.14	9.60	0.54	0.73	1.44

Beim Vergleich des durchschnittlichen, chemischen Bestandes bei männlichen und weiblichen Askariden bemerken wir keine

Abweichungen von der Durchschnittsnorm aller Angaben, selbst nicht bei Lipoiden.

Bei Weinland's Forschungsarbeiten an den Askariden war zufällig der trockene Rückstand etwas höher als unser Durchschnittsgehalt. Das ging jedoch auf Kosten der Stickstoff- und Lipoideningredientien. Man muss in Betracht ziehen, dass es sich bei ihm um einzelne Beobachtungen handelt, während wir es mit Massenbeobachtungen zu tun haben.

Das von uns vermerkte Maximum des trockenen Rückstandes war 28.60%. Die Zahlen des Stickstoffgehaltes und der Lipoiden steht weit hinter den Maximum Zahlen unserer Analysen zurück. (Tabelle II).

TABELLE II.

Mannliche Askariden	Minim.	Maxim.	Durchschnitt	Schwankung in %%	
Trock. Rückstand	13.54	25.07	19.18	-30	+30%
Organ. Stoffe	12.85	24.16	18.39	-30	+30
Asche	0.69	0.98	0.78	-12	+25.5
Ges. Stickst. Geh.	1.10	2.46	1.58	-30	+55
Lipoiden	0.90	1.73	1.23	-27	+40
<hr/>					
Weilb. Askaridem.					
Trock. Rückstand	13.61	28.57	19.17	-30	+45
Organ. Stoffe	13.01	27.45	18.93	-31	+45
Asche	0.42	1.12	0.79	-47	+42
Ges. Stickst. Geh.	1.08	2.06	1.46	-26	+41
Lipoiden	0.58	1.70	1.14	-30	+50

Unterscheidet sich auch der chemische Bestand der Spülwürmer bei männlichen und weiblichen Individuen nicht von einander und stimmen unsere Angaben in diesem Falle mit denen Weinlands überein, so zeigt die chemische Zusammensetzung der flachen und Spülwürmer einen klar hervorstehenden Unterschied: die Askariden haben im Vergleich mit flachen Würmern beinahe zweimal so viel trockenen Rückstand, organische Stoffe und Stickstoff und  $\frac{1}{3}$  mehr Asche. Der Unterschied im Lipoidengehalt übersteigt nicht die Grenzen der allgemeinen Durchschnittsnormen

der Fette für alle von uns untersuchten Wurmarten, sondern ist sogar niedriger. In Tabelle II geben wir die Schwankungsgrenzen der chemischen Zusammensetzung der von uns untersuchten männlichen und weiblichen Askariden.

Die Schwankungsgrenzen des chemischen Bestandes der Askariden ist nicht so gross wie bei den flachen Wurmarten. (I. A. Smorodinsew u. K. W. Bebeschin, 1936).

#### ZUSAMMENFASSUNG.

1. Beinahe kein Unterschied ist im chemischen Bestand der männlichen und weiblichen Askariden zu vermerken.
2. Die Askariden enthalten ungefähr zweimal so viel trockenen Rückstand, organische Stoffe und Ges. Stickstoffgehalt, als die flachen Würmer.
3. Der Mineralstoffgehalt der Askariden ist um 30% höher als bei flachen Würmern.
4. Der Lipoidengehalt der Askariden ist etwas niedriger als bei den flachen Würmern.

#### LITERATUR.

Smorodinzew, I. A. u. Bebeschin, K. W. (1933): Biochem. Z., 261, 176.  
Smorodinzew, I. A. u. Bebeschin, K. W. (1936): J. Biochem., 23, 19, 21.  
Weinland, E. (1902): Z. Biolog., 41, 66; 42, 55.



## ZUR FRAGE ÜBER DEN CHEMISMUS DES RIGORIS MORTIS.

von

I. A. SMORODINZEW und N. W. NIKOLAJEWA.

(Aus dem Forschungsinstitut der Fleischindustrie in Moskau.)

(Eingegangen am 22. August 1935)

Während einige Autoren den rigor mortis mit der letzten Kontraktion des absterbenden Muskels identifizieren Nysten (1811), so schreiben ihn andere der Gerinnbarkeit der Eiweisstoffe zu Sommer (1833). Schöne Daten, die von einem Parallelismus zwischen rigor mortis und Herabsetzung der Auflösbarkeit der Eiweisstoffe im Auszuge aus dem Kaninchenmuskel zeugen, finden wir in der Arbeit von Saxl (1906). Diese Arbeit gibt den Grund für die Behauptung ab, dass der Prozess der postmartalen Erstarrung sich in einer bestimmten Verbindung mit dem Zustande der Eiweisstoffe des Muskelplasmas befindet.

Sehr interessante Tatsachen wurden durch Mangold (1922) beim Studium der Leichenstarre am Kaninchenmuskel festgestellt. Die Härtemessung der Muskulatur ergab, dass bis zur dritten Stunde nach Schlachtung, keine Konsistenzerhöhung der Muskulatur zu verzeichnen sei. Eine abmessbare Steigerung der Dichte tritt in der 7-ten Stunde ein, wächst in der 24-sten Stunde bis auf 66,5% an, bleibt auf derselben Höhe bis zur 72-ten Stunde, wonach eine Abnahme der Konsistenz einsetzt.

Es sei bekannt, dass beim Verlauf der Leichenstarre eine grosse Rolle der freie Zutritt von Sauerstoff und der Gehalt an Milchsäure spielt.

Diese beiden Faktoren sind miteinander fest verbunden: die Unterbrechung des O<sub>2</sub>-Zutritts ruft sogar Muskelstarre beim lebendigen Tiere hervor; freier O<sub>2</sub>-Zutritt beugt sogar der Leichenstarre vor. (E. Winterstein, 1907).

Sauerstoff fördert die Entfernung von Milchsäure. Falls der Muskel mit physiologischer oder Ringerlösung durchwaschen wird,

so kommt es zur Beseitigung der Totenstarre E. Mongold (1903); Winterstein (1921). Bei erhöhten Gehalt an Milchsäure, tritt die Starre früher ein.

Unsere Beobachtungen I. A. Smorodinzew (1933) haben gezeigt, dass beim Grossvieh eine schnelle Anhäufung von Milchsäure in den ersten Stunden nach dem Schlachten einsetzt; sie erreicht ihr Maximum in der 24-ten Stunde, wonach sie scheinbar zum Stillstand kommt. In Verbindung mit der Anhäufung von Milchsäure wächst die  $H^+$  Konzentration, die ihren Höhepunkt ebenfalls in der 24. Stunde erreicht.

Die Zunahme der Milchsäure und Abnahme des pH des Mediums müssen unvermeidlich den Zustand der Muskeleiweißstoffe beeinflussen.

Beim Erforschen der postmortalen Veränderungen an Grossviehmuskeln haben wir uns zum Ziel gesteckt, die Verwandlung der Muskelplasma- und Stromeiweisstoffe in der ersten Stunde nach Ableben des Tieres, und Abhängigkeit dieses Prozesses von der umgebenden Temperatur zu verfolgen.

Die von uns gewonnenen Resultate stimmen gut mit den Beobachtungen von Mangold am Kaninchenmuskel überein und dürfen Stoff zur Erklärung und zum Verständnis des Totenstarrwesens abgeben.

#### METHODIK DER UNTERSUCHUNG.

Gesunden, mittelmässig gefütterten im Alter von 6–7 Jahren stehenden Kühen, wurden die Hinterviertelteile entnommen und bei +1–3° aufbewahrt. In bestimmten Zeitabständen wurden Fleischstücke abgeschnitten vom Fette und Bindegewebe befreit, durch Fleischhackmaschine zerstückelt, und Proben zur Bestimmung des Gesamteiweissstickstoffes, Myosin's Myogens und des Stromas entnommen. 10 g Fleisch wird sorgfältig im Mörser unter Hinzusatz von 150 ccm. 0,6 Mol KCl-lösung gemischt mit gleichen Volumina N/25 NaHCO<sub>3</sub> und N/100 Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> bei pH 9,1 verrieben (H. Weber, 1925).

Der gewonnene dünne Brei wird 15 Minuten lang zentrifugiert. Das Zentrifugat wird abgegossen, und der Rückstand 4-

malig wiederholt in denselben Zentrifugengläsern durch KCl bearbeitet, indem er eine halbe Stunde lang ausgezogen und darauf 15 Minut. zentrifugiert wird.

Beim fünften Mal wird durch 0,6 Mol KCl mit gleichem Volumine  $N/25$  NaHCO<sub>3</sub> und  $N/25$  Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gemischt bei pH 9,8 ausgezogen.

Der unaufgelöste Rückstand-Stroma wird kjelldalisiert. Sämtliche Auszüge werden zusammengezogen, im Messkolben bis auf 500 ccm. gebracht, und 100 ccm. der Lösung werden in frisch angefertigten Kollodium Hülsen mit  $N/130$  Phosphatpuffer bei pH=6,3 dialysiert, um Myosin von Myogen abzutrennen. Bei Verdünnung bis zur Konzentration 0,05 Mol KCl bei pH=7,0 wird Myosin ausgefällt. Dialysedauer 2 St. Nach der Dialyse wird der Inhalt des Reagenzglases zentrifugiert und durch ein grobporöses Papierfilter abfiltriert. Dabei tritt das Myogen in das Filtrat über und der Rückstand, der Myosin enthält, wird mit Wasser durchgewaschen. Sodann wird der Rückstand und das Filtrat nach Kjedahl verbrannt. In einer besonderen Probe vermittels Ausfällung mit 10% Trichloressigsäure wird der Gesamteiweissstoff des Fleisches bestimmt.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

An 8 gleichartigen Tieren verfolgten wir Stundengemäss die N-Veränderungen in den Myosin-, Myogen- und Stromafraktionen; prüften die Summe und Differenz der experimentellen Ergebnisse, nach Stickstoff in den entsprechenden Fraktionen ausgerechnet.

Als Beispiel führen wir in Tab. I die Analyseergebnisse, der bei einem Tiere gewonnenen Eiweissfraktionen, an. (6. Serie).

Die Zahlen der 2. Kolonne "Eiweisstickstoff" sind durch direkte Bestimmung erhalten; die Zahlen der 3. Kolonne sind die durch Summation der im Experiment für Myosin, Myogen und Stroma festgestellten Ziffern. Die Zahlen der 7. Kolonne "Stroma" entsprechen dem unmittelbar bestimmten in den Rückstandsätzen unaufgelösten Stickstoff. In der Kolonne 8 wird die Differenz zwischen dem Gesamteiweissstickstoff und dem Stickstoff der Summe der aufgelösten Fraktionen angeführt.

TABELLE I.  
Temperatur des Fleischaufbewahrung. +1–3°.

Stun- den	1 Gesamt- stick- stoff des Fleie- sches	2		3		4 Extra- hierter Gesamt- stick- stoff	5 Myo- sin N	6 Myo- gen N	7		8		9 Rest- stick- stoff				
		Eiweissstick- stoff							Storma Stickstoff								
		gefun- den	ausge- rechnet						gefun- den	ausge- rechnet							
1	3.05	2.74	2.87	2.22	0.91	0.96			1.00	0.87			0.35				
6	—	2.74	2.98	2.14	0.83	0.94			1.21	0.97			0.37				
24	—	2.80	3.12	1.50	0.34	0.86			1.92	1.60			0.30				
48	—	2.73	2.82	1.33	0.26	0.64			1.92	1.83			0.43				
72	—	2.79	3.00	1.25	0.19	0.85			1.96	1.75			0.42				
120	—	2.38	2.97	1.39	0.18	0.89			1.90	1.31			0.32				
240	—	2.70	2.79	1.71	0.20	0.98			1.61	1.61			0.53				

Wie zu ersehen ist, stimmen die tatsächlich gefundenen und ausgerechneten Größen gut überein, was als Bürgschaft für die Richtigkeit der ausgewählten Methodik gelten mag. Der Gesamteiweissstickstoff bleibt für die ganze Beobachtungszeit konstant, und weicht praktisch von der Durchschnittsnorm für das bestimmte Tier, gleich 2,7, nicht ab.

Der durch KCl extrahierte Gesamtstickstoff erleidet in der 6-sten Stunde keine Veränderung, sinkt in der 24-sten Stunde um 32,4% und in der 72-sten Stunde um 43,7%, später tritt eine geringe Erhöhung ein.

Unsere Angaben stimmen gut mit denen von Mangold überein, wonach eine messbare Erhöhung der Konsistenz des Kaninchensmuskels von der 7. Stunde an beginnt, in der 24. St. ihr Maximum erreicht, bis zur 72. St. anhält, worauf ein Nachlassen der Konsistenz einsetzt.

Die Kolonne 5 gibt an, auf wessen Kosten ein Absinken des in KCl auflösbarer Stickstoffs stattfindet. Die Myosinmenge, die in der 6 sten Stunde eine geringe Einbusse erleidet, nimmt in der 24. Stunde um das Dreifache, ab, erreicht  $\frac{1}{5}$  in der 72. St. und bleibt auf dieser Höhe bis zum Beobachtungsschluss.

Was das Myogen betrifft, so erleidet es keine solchen beträcht-

lichen Veränderungen (Kolonne 6) : eine kaum merkbare Abnahme in der 6-sten St. gelangt bis 10,4% in der 24. Stunde, erreicht ihr Maximum von 33,3% in der 48. St.; wird ferner durch einen Anstieg bis zur Ausgangsgrösse in der 240. Stunde abgewichen.

Der Abnahme des in KCl auflösbarer Stickstoffs verläuft parallel eine Zunahme des "Stroma" (Kolonne 7 und 8); eine geringe Myogen- und Myosinabnahme in der 6-sten Stunde ergibt bei Addition eine Zunahme des Stromas um 20%, die in 24-72-ster St. bis zu 93-96% ansteigt, wonach in Uebereinstimmung mit den betreffenden Beobachtungen von Mangold über die Abnahme der Konsistenz der erstarrten Muskeln in der 72-sten St., ein Absinken der Stickstoffmenge des Stromas zu verzeichnen ist.

Um nach Möglichkeit den Einfluss der individuellen Schwankungen, die von den Eigentümlichkeiten des einen oder anderen Tieres abhängen, zu eliminieren, addierten wir die Daten unserer sämtlichen Versuche, stundengemäss nach Abschlachten des Tieres und stellten auf Grund dieser Mittelwerte die Gesamttabellen Nr. 2, 3 und 4 her.

TABELLE II.  
Mittelwerte der Gesamtserien bei +1-3° in % roher Einwaage.

Stunden	Gesamt No.	Eiweiß N.		Extra- harter gesamt N.	Myosin N	Myogen N.	Stroma N.		Reststick- stoff	Konsis- tenz
		gef.	ausge- rechnet				gef.	ausge- rechnet		
1	3.30	2.86	2.91	2.30	0.98	0.98	1.02	0.98	0.48	10.0
9		2.91	2.98	2.34	0.95	0.90	1.14	1.14	0.44	—
24		2.88	2.97	1.71	0.44	0.85	1.65	1.61	0.40	11.2
48		2.83	2.97	1.63	0.35	0.87	1.77	1.67	0.44	12.0
72		2.93	3.05	1.65	0.36	0.98	1.73	1.63	0.41	13.9
120		2.88	2.98	1.60	0.30	0.91	1.69	1.69	0.42	14.8
240		2.87	2.98	1.62	0.35	0.98	1.70	1.72	0.42	—

Durch einen besonderen Messapparat, vermittels einer in die Tiefe des Fleisches eindringenden stumpfen Nadel haben wir die Konsistenz des zu verschiedenen Zeiten aufbewahrten Fleisches bestimmt. Es wurde von uns nach Durchschnittsangaben fest-

gestellt, dass in der 24-sten Stunde im Vergleich zum frischen Fleisch die Konsistenz um 12%, in der 48-sten Stunde um 20% und am 3-5 Tage um 50 abnimmt. (Bei 36° tritt eine Abnahme der Konsistenz noch schneller ein und erreicht zur 24-sten Stunde 50% und zur 48-sten St. 94%).

Nach diesen Angaben ist die Fleischkonsistenz nach Todeseintritt in der ersten Stunde höher als nach 24 Stunden.

TABELLE III.  
% zum Gesamtstickstoff im Durchschnitt bei +1—3°.

Stunden	Eiweiss N.	Extrahierter Gesamt N.	Myosin N.	Myogen N.	Stroma N.	Rest N.
1	86.90	69.70	29.70	29.70	30.91	14.54
6	88.20	70.91	28.78	27.27	34.54	13.33
24	87.27	51.81	13.30	25.75	50.00	12.14
48	85.76	49.40	10.60	26.36	53.63	13.33
72	88.79	50.00	10.90	29.70	52.42	12.42
120	87.27	48.48	9.90	27.57	51.51	12.70
240	86.97	49.10	10.60	29.70	51.51	12.70

TABELLE IV.  
% zur 1-sten Stunde nach Mittelwerten. Aufbewahrung des Fleisches bei +1—3°.

Stunden	Eiweiss N.	Extrahierter Gesamt N.	Myosin N.	Myogen N.	Stroma N.	Rest N.
1	100	100	100	100	100	100
6	102.0	101.7	97.0	91.8	111.7	91.7
24	100.5	74.3	44.9	86.7	161.6	83.3
48	99.0	70.8	35.8	89.6	173.7	91.7
72	102.6	71.8	36.8	100	169.7	85.4
120	100.5	69.5	30.6	92.8	165.7	87.5
240	100.3	70.4	35.7	100	166.6	87.5

Hier sehen wir ebenfalls, dass der Gesamteiweisstickstoff in Tatsache unverändert bleibt, und die Menge des in KCl auflösaren N in der 24-sten Stunde um 25%, in der 48-72. Stunde um 30% abnimmt und auf dieser Höhe bis zum Beobachtungsschluss

verharrt.

Nach unseren Angaben wird beim Kuhfleisch nach Schlachtung in der 6-sten Stunde durch KCl 70% des Gesamtstickstoffs, nach Weber (1925) 75% (beim Kaninchenfleisch) nach Saxl (1906) 87%, in der 1-3 St. (Kaninchenfleisch, Aufschliessung durch NH<sub>4</sub>Cl, eine andere Methode der Eiweissbestimmung) aufgeschlossen.

Nach Angaben von Saxl besteht das in Salzen auflösbare Kaninchenfleischeiweiss in 86% aus Myogen und enthält nur 14% Myosin; nach Weber (1931), im Gegenteil, enthalten Kaninchenmuskeln 25-30% Myogen und 70-75% Myosin. Wir aber haben in der 1-sten Stunde nach Ableben der Kuh, nach Mittelwerten, ungefähr gleiche Mengen von Myosin, Myogen und Stroma (je 30%) gefunden, d. h. nach Abzuge des Reststickstoff, je 43% des einen wie des anderen vom Gesamten den in KCl auflösaren Stickstoffverbindungen.

Während nach den Angaben von Saxl und unseren Beobachtungen (Tab. IV) in der 24. Stunde das Myosin annähernd um das Zweifache abnimmt, ist beim Gehalt an Myogen ein wesentlicher Unterschied zu verzeichnen:

Nach Saxl nimmt die Myogenmenge um das Zweifache, nach unseren Beobachtungen aber um 13% ab.

Diese Differenz kann wohl vom Unterschied in der Methodik wie auch von Besonderheiten der Tierart herstammen (Kaninchen, Kuh).

Die Stromamenge steigt in den Versuchen von Saxl in der 24-sten Stunde auf Kosten zunehmender Denaturation des Myogens fast um das 6-fache, nach unseren Daten aber nur um 60% an, allein die Verlaufsrichtung des Prozesses bleibt in beiden Fällen dieselbe.

Die durch KCl extrahierte Stickstoffmenge der Eiweisee wird mit der des im Salz unauflösbar Eiweisses ausgeglichen (Tab. III) und verharrt in dieser Höhe bis zum Schluss der Beobachtung. Folgerichtig nach der Stromamenge zu urteilen, wird das Maximum der Erstarrung in der 24-sten Stunde erreicht und trifft mit maximaler Anhäufung von Milchsäure und Konzentration

der Wasserstoffionen (I. A. Smorodinzew, 1933) zusammen.

Zunahme des Stromas geschieht hauptsächlich auf Kosten einer Abnahme des Myosins, denn praktisch bleibt das Myogen während der ganzen Beobachtungsdauer unverändert. Der Reststickstoff (Kolonne 9) bleibt auch für die ganze Zeit konstant, nimmt sogar im Vergleich zur ersten Stunde etwas ab. Folgerichtig, sei es untypisch von einem Abbau der Eiweisse im Muskelgewebe während 10-tägiger Aufbewahrung bei  $+1-3^{\circ}$  zu sprechen.

Analysieren wir diese Daten, so kommen wir zum Schluss, dass die postmortale Muskelstarre durchaus nicht mit der Koagulation des Plasmaeiweisses zu identifizieren sei: die Muskelstarre beginnt in den ersten Stunden nach Ableben des Tieres, eine messbare Steigerung der Muskelkonsistenz kommt erst nach 7 Stunden zum Ausdruck (Mangold), und eine beträchtliche Koagulation der Eiweisse wird erst in der 24-ten Stunde verzeichnet, wenn die Muskelkonsistenz abzunehmen beginnt.

In den folgenden Stunden löst sich die Erstarrung auf, die Konsistenz nimmt zusehends ab, und die Menge der unkoagulierten Eiweisse bleibt dieselbe.

Auf Grund dieser Daten müssen wir die Erklärung von Waker (1927) wonach die postmortale Erstarrung durch die Spannung  $\text{CO}_2$  bedingt sei, dass aus Karbonaten unter dem Einfluss der aus Glykogen und Zucker sich bildenden Milchsäure befreit wird, als wahrheitsgerechter gelten lassen. Bei Auflösung der Starre wird das  $\text{CO}_2$  aus den Muskelementen herausdiffundiert und der Muskel, ganz unabhängig vom Gehalt an koagulierten und unkoagulierten Eiweisstoffen, wird erschlafft.

Auch ist bei diesem Vorgang die Beteiligung des osmotischen Drucks nicht wegzuleugnen, der durch Anhäufung von beim postmortalen Zerfall der grösseren Moleküle sich bildenden kleineren (W. A. McDougall, 1897/98) und Gelatinierung der Eiweisstoffe bei Steigerung der Konzentration der Wasserstoffionen bedingt ist. (Waker).

Die ansteigende Abnahme der Konsistenz der Muskeln nach 72-ter Stunde bedingt eine Zunahme der Zartheit und Verbesserung der Geschmackseigenschaften des Fleisches in 72 Stunden

nach Tierschlachtung, wie es in unserem Laboratorium durch Degustationsversuche festgestellt wurde (I. A. Smorodinzew, unveröffentlicht).

*Einfluss der Erhöhten Temperatur auf den  
Vorgang der Erstarrung*

Um die Abhängigkeit der Eiweissveränderungen bei Muskelerstarrung von der Temperatur aufzuklären, wurden gleichnamige Teile sämtlicher von uns untersuchten Kühe im Thermostaten bei 36–37° belassen und die in der 1–6–24–48-sten Stunde entnommenen Proben auf dieselbe Art untersucht.

Wie es auch zu erwarten war, erfahren unter dem Einflusse der erhöhten Temperatur sämtliche Prozesse eine Beschleunigung: eine Abnahme des mit Salz extrahierten Gesamtstoffs beginnt bereits in der 5-ten Stunde und erreicht ihr Maximum nicht in der 120-sten Stunde, wie es bei +1–3° geschah, sondern in der 24-sten Stunde.

Myosin und Myogen nehmen in gleicher Weise in 6-ster Stunde um 20% ab, und der Reststickstoff steigt, im Vergleich zur ersten Stunde nach Schlachtung, sprunghaft, um 25%, an.

TABELLE V.  
Mittelwerte nach sämtlichen Serien in % roher Einwaage  
Flechaufbewahrung bei 36°.

Stunden	Eiweissstick- stoff		Extrahierter Gesamtstick- stoff	Stickstoff		Stromastick- stoff		Rest- stick- stoff
	gefun- den	ausge- rechnet		Myo- sin	Myo- gen	gefun- den	ausge- rechnet	
1	2.86	2.91	2.30	0.98	0.98	1.02	0.98	0.48
6	2.93	3.02	2.17	0.81	0.77	1.44	1.50	0.60
24	2.83	2.97	1.70	0.31	0.91	1.71	1.69	0.43
48	2.80	2.94	1.88	0.63	0.79	1.53	1.40	0.47

Entsprechend der in der 6-sten Stunde erfolgenden Abnahme von Myosin und Myogen wächst der Stromastickstoff um 41% an.

In unseren früheren Arbeiten I. A. Smorodinzw, N. W. Shirokow u. P. W. Zygona (1933) haben wir wiederholt

TABELLE VI.  
 % zum Gesamtstickstoff nach Mittelwerten  
 Fleischaufbewahrung bei 36%.

Stunden	Eiweiss N.	Extrahierter Gesamt N.	Myosin N.	Myogen N.	Stroma N.	Rest N.
1	86.93	67.70	29.70	29.70	30.91	14.54
6	88.79	65.75	24.54	23.33	43.63	18.18
24	85.76	51.51	9.39	27.57	51.81	13.03
48	84.85	56.97	19.09	23.94	46.36	14.24

TABELLE VII.  
 % zur ersten Stunde nach Mittelwerten Fleischaufbewahrung bei 36°.

Stunden	Eiweiss N.	Extrahierter Gesamt N.	Myosin N.	Myogen N.	Stroma N.	Rest N.
1	100	100	100	100	100	100
6	102.5	94.4	82.5	78.6	141.0	125.0
24	99.0	73.9	31.6	93.0	167.5	89.5
48	97.8	81.8	64.3	80.6	150.0	98.0

darauf hingewiesen, dass in der 6-sten Stunde nach Schlachtung beträchtliche Störungen im Chemismus des Muskelgewebes eintreten, und dieses verdient einer besonderen Würdigung. In den 24-sten Stunde sinkt das Myosin bis zum Minimum von 31,6% ab, (Tab. VII) was bei +1—3° Fleischaufbewahrung nur in 120-sten Stunde erreicht wird (Tab. IV). Das Stroma steigt bis zum Maximum von 67.5% an.

Unter dem Einfluss der Fermente der Fäulnisbakterien (organoleptisch wird eine evidente Fleischzersetzung festgestellt) erfolgt in der 48. Stunde eine Abnahme von N in der "Stroma" und "Myogenfraktion, auf deren Kosten die "Myosin"-fraktion beträchtlich zunimmt, d. h. die Stickstofffraktion derjenigen Verbindungen, die bei der Dialyse den Niederschlag bilden.

Das von uns gewählte Verfahren der Trennung von Myosin (Ausfällung bei Dialyse) gilt auch für die Ausfällung von Heteroalbunosen, so im vorliegendem Falle hängt zweifelsohne das Ansteigen der "Myosin" fraktion gleichzeitig von Ausfällung der

Heteroalbumosen, die sich aus den Plasma- und Stromaeiweissstoffen bilden, zusammen. Frisches, unverdorbenes Kuhfleisch enthält, wie wir es in speziellen Untersuchungen erwiesen haben, weder Albumosen, noch Peptone. (I. A. Smorodinzew: unveröffentlicht.)

Somit leistet die von uns gewählte Methode Gewähr gerade für die Bestimmung des Myosin-Myogengehalts in den entsprechenden Fraktionen des unverdorbenen Fleisches, das jeglicher Beimischung von Albumosen und Peptonen bar ist.

Die verhältnismässige Stabilität des Rest N. spricht gegen die Bildung (in den 48 Stunden bei Beginn der Fäulnis) einer beträchtlichen Menge von Produkten des tiefeingreifenden Eiweissabbaus. Die Auflösung der Starre tritt bei 36° bedeutend früher ein, was daraus zu ersehen ist, dass solches Fleisch bereits in der 24-sten Stunde nach den Degustationsangaben, nach organoleptischen Zeichen und physikalisch-chemischen Faktoren (I. A. Smorodinzew, unveröffentlicht), demjenigen Fleische entspricht, das 3–5 Tage lang bei +1–3° aufbewahrt war. Für den Zustand der Fleischzersetzung ist charakteristisch, dass der Stickstoff der durch KCl extrahierbaren Verbindungen den des Stromas abermals überragt.

#### SCHLUSSFOLGERUNGEN.

1. Kuhfleisch enthält in der ersten Stunde nach Ableben des Tieres gleiche Mengen von Myosin, Myogen und Stroma (ungefähr je 1% bis je 30% vom Gesamtstickstoff des Fleisches).
2. In den 1-sten Stunde nach Schlachtung tritt 70% des Gesamtstickstoffs des Fleisches in die Salzlösung über.
3. In dieser Lösung fallen 43% aufs Myosin, ebensoviel auf Myogen und 14% auf den Reststickstoff.
4. Die Menge des bei +1–3° durch die Salzlösung extrahierten Stickstoffs nimmt in der 24-sten im Vergleich zur ersten Stunde um 25% ab.
5. Die Menge des Myosins nimmt nach Ablauf von 24 Stunden um 55% ab.
6. Die Menge des Myogens wechselt bei +1–3° während der

ganzen Aufbewahrungsdauer wenig und verbleibt beinahe konstant, um 8–10% niedriger als die der ersten Stunde.

7. Die Menge des Stromas steigt am Ende der 24-ten Stunde um 60% an.

8. Die Zunahme von Stroma muss den Übertritt eines beträchtlichen Myosinteiles in einen in Salzen unauflösbar Zustand zugerechnet werden.

9. Der durch die Salzlösung extrahierte Gesamtstickstoff bleibt von 24-ster Stunde bis 240. Stunde der Fleischaufbewahrung fast konstant.

10. Die Myosinmenge nimmt in 48-ster Stunde ums dreifache ab und bleibt auf dieser Höhe stabil.

11. Im Fleische, das bei 36° aufbewahrt war, setzt bereits in 6-ster Stunde ein Abstieg des in Salzen auflösbarer Gesamtstickstoffs ein, das Myosin sinkt um 17%, und das Myogen sogar um 21%.

12. Die Stromamenge verbleibt, beginnend von 24-ster Stunde um 60% höher als die der ersten Stunde, fast stabil.

13. Im Fleische, das im Thermostaten aufbewahrt war, sinkt das Myosin in 24. Stunde zum Minimum (32%), das Stroma steigt zum Maximum um 67%, und die Myogenmenge steigt im Vergleich zur 6-sten Stunde um 15%.

14. Unter dem Einfluss der Fermente der Kleinlebewesen, werden die Eiweisse in 48-ster Stunde peptonisiert, wodurch Rückstand bei Dialyse (Heteroalbomosen) zunimmt.

15. Der Gesamteiweisstickstoff entspricht, nach Abzug des summierten Myosin und Myogenstickstoffs, dem des Stromas, der unmittelbar durch Analyse bestimmt wird.

16. Die Stabilisierung der Eiweisse bei der Fleischaufbewahrung geschieht auf Kosten des Übertritts eines beträchtlichen Myosinteiles in einem in Salzen unauflösbar Zustand (Stroma).

17. Der Reststickstoff steigt bei der Fleischaufbewahrung nicht an, was gegen einen Eiweissabbau spricht.

18. Muskelstarre darf nicht mit Plasmaeiweisskoagulation identifiziert werden.

LITERATUR.

Mangold, E. (1922): Pflüg. Arch., **196**, 205.  
McDogall, W. A. (1898): J. of anat. phys., **31**, 910; **32**, 187.  
Saxl, P. (1906): Hofm. Beitr., **9**, 1.  
Smorodinzew, I. A. (1933): Biochem. Zeits., **267**, 18.  
Smorodinzew, I. A. (1933): Biochem. Zeits., **266**, 274; **267**, 18.  
Smorodinzew, I. A. u. Mitarb.  
Smorodinzew, I. A., Shirokow, N. W. u. Zyanowa, P. W. (1933):  
Biochem. Zeits., **262**, 425.  
Waker, L. (1917): Berl. Klin. Ws., **54**, 153., Biochem. Zeits., **184**, 192  
(1927).  
Weber, H. (1925): Biochem. Zeits., **158**, 462.  
Weber, H. (1931): Physiol. Ber., **61**, 382.  
Winterstein, E. (1907): Pflüg. Arch., **120**, 225.  
" " (1921): Pflüg. Pflüg. Arch., **191**, 184.



## GLYOXALASE AND ITS CO-ENZYME.

### II. On Kidney Glyoxalase.

By

K. NAGAYA, S. YAMAZOYE AND S. NAKAMURA.

(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College,

Director: Prof. N. Ariyama.)

(Received for publication, July 3, 1935)

On comparing the glyoxalase content of fresh animal tissues, Ariyama (1928) and Sakuma (1930), found that kidney hashes showed relatively high activity of the enzyme. This finding was considered later by Platt and Schroeder (1934, ii) to be doubtful, on the basis of their observation that the watery extract of kidney showed very weak activity. We have often observed that kidney is quite different from other tissues in the behavior of glyoxalase. It is one example among many that the enzyme activity is high when tissue hashes are employed, while it is low in tissue extracts. In reality the American investigators mentioned in the same paper that kidney slices were highly active as the source of glyoxalase. The results of the experiments made in our laboratory with regard to kidney glyoxalase are summarized in the following observations.

### EXPERIMENTAL.

#### *Material and measuring methods.*

The glyoxalase preparation. It was prepared in the usual way by extracting animal tissues which were ground thoroughly with sand, with 4 times their weight of water for a period (from 10 to 30 minutes) at room temperature.

Methylglyoxal was determined by our colorimetric method or by Barrenscheen's method (1931); lactic acid by the Friedemann, Cotonio and Shaffer method (1927); glutathione by the Kühnau (1931) or Woodward and Fry method (1932).

Deproteination was carried out in most cases with trichloroacetic acid.

*Behavior of glutathione during the action of glyoxalase.*

When methylglyoxal was converted into lactic acid by the action of glyoxalase, glutathione which was added in sufficient quantities to the enzyme system as its co-enzyme, showed a rapid initial decrease at approximately equimolecular rate with methylglyoxal which decreased. Then it remained at the minimum value as long as a certain amount of the substrate was still left. No sooner was the greater part of methylglyoxal converted into lactic acid, than glutathione showed a prompt recovery, reaching nearly the original value. This decrease and subsequent recovery of glutathione was able of demonstration repeatedly by adding methylglyoxal anew to the system after the complete recovery of glutathione. The graphical summary of the results is shown in Fig. 1. It will be recalled in this connection the hypothesis of Jowett and Quastel (1933) that methylglyoxal would combine with glutathione before converting into lactic acid. This hypothesis which was later supported by Platt and Schroeder (1934, i), and Girsavicius and Heyfetz (1935), rested upon the chemical fact that iodine-combining power of glutathione decreased when it was brought into contact with methylglyoxal in strong acid medium. We have realized that the union and disunion between methylglyoxal and glutathione takes place under biological conditions through the action of glyoxalase. The union between methylglyoxal and glutathione which was achieved under chemical conditions was very sensitive towards excess of iodine. Yamazoye (1933) pointed out that this union was easily disrupted under the condition of the Kühnau method. The union which was performed by the glyoxalase action was stable against iodine, and its existence was demonstrable by the Kühnau method. More detailed studies on the behavior of glutathione during the glyoxalase action are under progress.

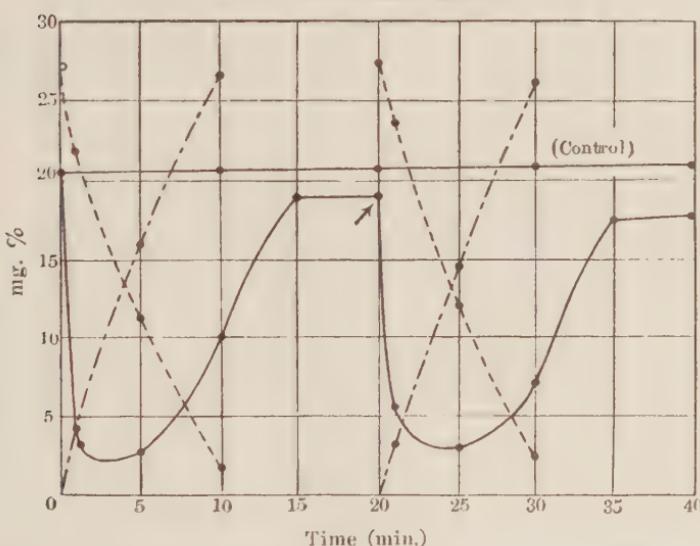
Glyoxalase of rabbit kidney exhibited somewhat different features from other tissues compared with the above-mentioned

Fig. 1.

*Behavior of Glutathione during Action of Liver Glyoxalase.*

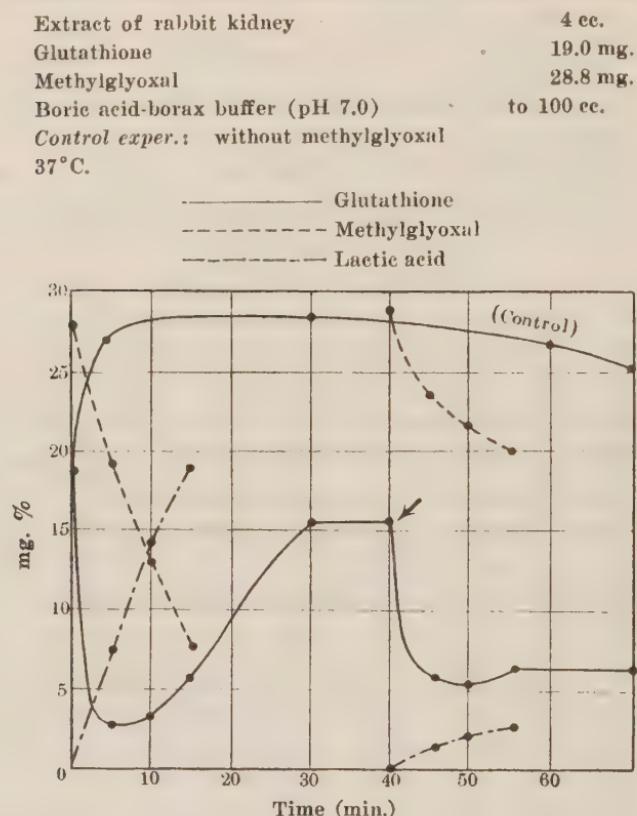
Extract of rabbit liver 2 cc.  
 Glutathione . 20.0 mg.  
 Methylglyoxal 27.2 mg.  
 Boric acid-borax buffer (pH 7.0) 60 cc.  
 Water to 100 cc.  
*Control exper.:* without methylglyoxal.  
 37°C.  
 Time of second addition of methylglyoxal is pointed by arrow.

— Glutathione  
 - - - - Methylglyoxal  
 - - - Lactic acid



behavior of glutathione. The first decrease-increase of the added glutathione was carried out by kidney glyoxalase almost in the same way as by extracts of other tissues. However, the recovered glutathione behaved abnormally with the second addition of methylglyoxal which was made usually 40 or 60 minutes after the first addition. The iodine-combining power decreased rapidly also in this case, but the subsequent recovery was very poor and the conversion of methylglyoxal into lactic acid was low. The results are illustrated in Fig. 2. That the enzyme itself was not weakened

Fig. 2.

*Behavior of Glutathione during Action of Kidney Glyoxalase.*

after the first addition of methylglyoxal was known from the fact that the simultaneous supply of fresh glutathione with the second addition of methylglyoxal caused the conversion of methylglyoxal into lactic acid at almost the same velocity as in the case of the first addition.

There was another distinction between glyoxalase preparations of kidney and other tissues. It is revealed in control experiments of Fig. 1 and 2, and in Table I, that the iodine-combining power of the added glutathione increased remarkably during the incubation in the case of kidney, while the power remained almost constant in other cases. The detailed account on this point will be given below.

TABLE I.  
Incubation of Glutathione with Kidney Extract.

## Series A:—

4 cc. kidney extract, 20.0 mg. glutathione and 75 cc. of pH 7.0 boric acid-borax buffer were incubated at 37°C. At intervals (0, 20 and 40 min.) 28.8 mg. methylglyoxal were added, diluted to 100 cc., and the decrease of glutathione and methylglyoxal was examined frequently.

## Series B:—

Conditions were same to Series A, but with a different sample of kidney extract. Intervals of incubation were 0, 15, 30, and 60 min.

Time of examination of substances (min.)	Substances present (mg. %)															
	Series A							Series B								
	Time of incubation (min.)				Time of incubation (min.)				Time of incubation (min.)				Time of incubation (min.)			
	0	20	40	—	0	15	30	—	0	15	30	—	0	15	30	—
	SH* <sup>1</sup>	MG* <sup>2</sup>	SH	MG	SH	MG	SH	MG	SH	MG	SH	MG	SH	MG	SH	MG
0	23.3	28.8	28.0	28.8	33.1	28.8	20.5	28.8	23.4	28.8	25.6	28.8	28.5	28.8	—	—
5	5.7	15.0	8.2	15.9	10.9	—	3.2	17.3	5.8	17.3	7.2	—	7.3	22.6	—	—
10	8.6	6.5	9.9	8.8	—	—	5.0	8.8	7.2	10.9	8.1	14.2	6.9	20.5	—	—
15	15.1	+	—	—	10.9	16.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
20	15.5		12.7	++	—	—	13.6	2.6	13.1	2.9	10.9	6.4	8.4	19.2	—	—
30			15.1	+	11.0	12.9	16.9	0	16.9	1.9	13.6	3.4	9.6	18.9	—	—
50					12.3	12.3	16.6		16.1		13.5	2.6	10.0	—	—	—
100					13.9	11.0							11.7	15.9		

\*1 SH = Iodine-combining power expressed as mg. of glutathione.

\*2 MG = Methylglyoxal.

The experiments stated above were followed by the experiments in which glutathione was incubated with kidney extract for a different length of time before its behavior as the co-enzyme was examined. It was found that after the contact with the kidney extract, glutathione decreased as rapidly as the fresh sample at the time of the action of glyoxalase. However, the incubated glutathione acted very poorly as the co-enzyme of glyoxalase, and the recovery of the iodine-combining power following the foregoing decrease was incomplete. These tendencies were observed more clearly with the prolongation of the incubation of gluta-

thione with kidney extract. As given in Table I the gradual fall of the velocity of the decrease of methylglyoxal during the incubation was accompanied by the progressive reduction of both velocity and extent of the recovery of the iodine-combining power. After 60 minutes' contact, the decrease of methylglyoxal and the recovery of the iodine-combining power was profoundly reduced. At this time, the addition of coenzyme-free liver glyoxalase which was powerfully active in the presence of glutathione, was completely ineffectual in promoting the decrease of methylglyoxal and the recovery of the iodine-combining power. The same liver glyoxalase, if added after a shorter incubation than 60 minutes, accelerated the conversion of methylglyoxal into lactic acid and the recovery of the iodine-combining power. The acceleration was more marked with shorter duration of the contact. The accelerating effect of liver glyoxalase on the recovery of the iodine-combining power was noticed only in its velocity, the extent of the recovery remaining unaltered. Details are given in Fig. 3.

From the evidence cited above the following conclusion may be deduced. On contact with kidney extract glutathione reacts with an unknown constituent of kidney, leaving the SH-group of glutathione intact. The reaction-product can still combine with methylglyoxal at its SH-group at the same velocity as free glutathione, but once the combination between these substances is established the compound offers greater resistance against glyoxalase, while the union between methylglyoxal and free glutathione is easily disrupted by the further action of the enzyme. It is quite probable from the above consideration that the inhibitory effect of the kidney factor on glyoxalase is attributable to the formation of the reaction-product between the kidney factor and glutathione. In this way the mechanism of the inhibitory action of the kidney on glyoxalase has been, we think, elucidated to a certain extent.

Contrary to free glutathione, the reaction-product of glutathione with the kidney factor combined with methylglyoxal in the absence of glyoxalase formed a compound which was quite stable towards iodine; the existence of the compound was easily demonstrated by the Kühnau method. The results are listed

Fig. 3.

*Supply of Glyoxalase after Incubation of Glutathione with Kidney Extract.*

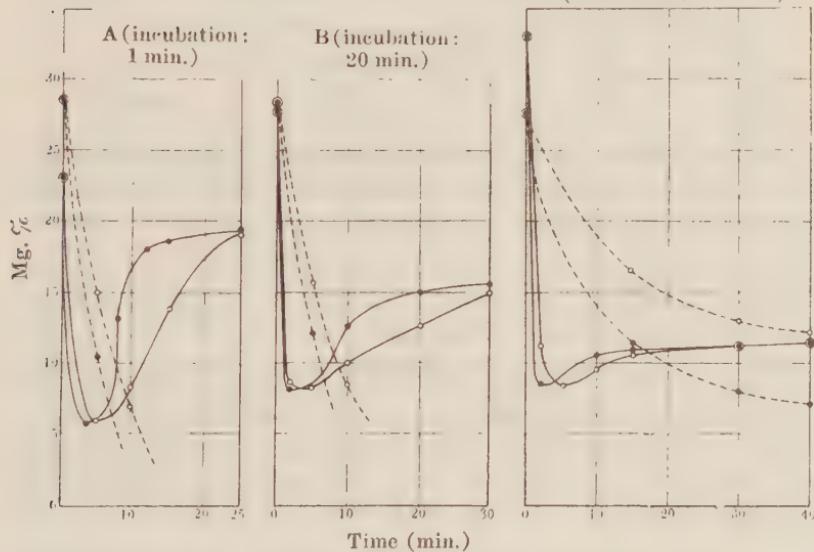
4 cc. of extract of rabbit kidney, 20.0 mg. of glutathione and 75 cc. of pH 7.0 boric acid-borax buffer were incubated at 37°C.

*Exper. I:*—After 1, 20 and 40 minutes' incubation 28.8 mg. of methylglyoxal were added, diluted to 100 cc., and the decrease of glutathione and methylglyoxal was examined frequently.

*Exper. II:*—Besides methylglyoxal, 4 cc. of coenzyme-free liver glyoxylase were added.

—○—	Glutathione in Exper. I
—●—	Glutathione in Exper. II
-○-	Methylglyoxal in Exper. I
-●-	Methylglyoxal in Exper. II

C (incubation: 40 min.)



in Table II. After incubating glutathione with the kidney extract for 150 minutes at 37°C., the solution was kept for 5 minutes at about *n*/10 HCl-acidity, and then neutralized with sodium hydroxide. Glyoxalase of the kidney extract was completely inactivated by this treatment, but the iodine-combining power of the solution decreased distinctly on addition of methylglyoxal, when the power was examined by the Kühnau method. This reaction was completed at the moment of the addition of methylglyoxal. Thus it appears that the combination between methylglyoxal and

TABLE II.

Combination of Methylglyoxal with Glutathione which was Incubated with Kidney Factor.

4 cc. kidney extract, 20 mg. glutathione and 60 cc. pH 7.0 boric acid-borax buffer were diluted to 80 cc. and incubated at 37°C. for 150 minutes. Then 2 cc. of 2*N* HCl were added. After the lapse of 5 minutes the solution was neutralized with 2*N* NaOH and diluted to 100 cc.

*Exper. I.* 80 cc. solution were diluted to 100 cc. and incubated further.  
 „ *II.* 80 cc. solution were added with 4 cc. of 0.1*M* methylglyoxal and diluted to 100 cc.  
 „ *III.* 80 cc. solution were added with 4 cc. of 0.1*M* methylglyoxal and 2 cc. coenzyme-free liver glyoxalase solution and diluted to 100 cc.

Time (min.)	Substances present (mg. %)					
	Exper. I		Exper. II		Exper. III	
	Gluta-thione*	Methyl-glyoxal	Gluta-thione*	Methyl-glyoxal	Gluta-thione*	Methyl-glyoxal
0	11.5	0	11.5	28.8	11.5	28.8
1	11.5	0	++	27.2	++	27.3
30	9.30	0	+	27.3	+	27.7

\* Iodine-combining power as glutathione.

the reaction-product of glutathione with the kidney factor acquires greater resistance toward disrupting effects, such as iodine or glyoxalase, in comparison with combinations between methylglyoxal and free glutathione, which are formed in presence and absence of glyoxalase.

Cysteine behaved in a similar way to the glutathione which was treated with the kidney factor. As shown in Table III, cysteine, when examined by Kühnau's method, reacted with methylglyoxal instantaneously in the absence of glyoxalase. The reaction took place at the equimolecular rate. Lucas and King (1932) observed in their experiments of the direct iodometric titration of cysteine, that the iodine-combining power of cysteine was dependent upon the acidity of the medium; the power was higher at lower acidity. The similar effect of the acidity on iodine-combining power was observed in the reaction-product of glut-

TABLE III.  
Reaction between Cysteine and Methylglyoxal.

In 100 cc.:—

*Exper. I.* 28.8 mg. methylglyoxal, 18.0 mg. cysteine and 60 cc. pH 7.0 boric acid-borax buffer solution.

" *II.* 28.8 mg. methylglyoxal, 18.0 mg. cysteine, 4 cc. coenzyme-free liver glyoxalase and 60 cc. buffer solution.

Temperature = 37°C.

Time (min.)	Substances present (mg. %)			
	Exper. I		Exper. II	
	Cysteine	Methylglyoxal	Cysteine	Methylglyoxal
0	18.0	28.8	18.0	28.8
1	4.9	21.2	4.6	21.7
20	4.3	21.2	4.2	21.2

athione with the kidney factor. The power determined by the Kühnau method increased with decreasing acidity of trichloroacetic acid. The reaction-product of glutathione with the kidney factor reacted with  $\beta$ -naphthoquinone-4-sodium sulfonate and developed the color which was stated by Hunter and Eagles (1927) to be specific for cysteine. Cysteine did not increase its iodine-combining power when it was incubated with the kidney extract.

The rate of the conversion of methylglyoxal into lactic acid by kidney glyoxalase became smaller as the incubation of the enzyme with glutathione proceeded. The rate was reduced to 20–30% after 60 minutes' incubation, while it was usually over 70% in fresh kidney extract. This may be explainable, at least partly, by the fact that the glutathione which has been brought into contact with kidney can unite with methylglyoxal, but the combined methylglyoxal cannot be subsequently changed into lactic acid. Thus the disappearance of methylglyoxal becomes larger in comparison with the production of lactic acid, and the rate of conversion falls.

The inhibitory action of rabbit kidney on glyoxalase was observable not only in the extract but also in tissue slices (see Table IV). We were unable to confirm Platt and Schroeder's statement (1934 ii) that the inhibitor was present only in the extract.

TABLE IV.  
Action of Kidney Slices on Glutathione.

3 gm. kidney slices, 210 mg. glutathione and 60 cc. pH 7.0 boric acid-borax buffer were incubated at 37°C.

*Exper. I.* At the start of incubation, 28.8 mg. methylglyoxal were added and diluted to 100 cc.

„ *II.* After 50 minutes' incubation, methylglyoxal was added.

*Control exper.* Kidney slices and glutathione were incubated without adding methylglyoxal.

Time (min.)	Substances present (mg. %)				
	Exper. I		Exper. II		Control
	Glutathione*	Methylglyoxal	Glutathione*	Methylglyoxal	Glutathione*
0	23.5	28.8	33.8	28.8	23.5
1	11.2	26.2	11.8	26.0	—
5	5.7	19.8	9.9	24.4	—
10	7.1	11.5	11.0	22.3	—
20	16.5	2.4	11.6	20.2	—
30	19.7	0	12.0	19.1	27.8
50	24.2		12.4	15.3	33.8
70	—		12.3	13.0	34.0 (180 min.)

So far, examined kidneys of rabbits and dogs were active, whereas those of hens, pigeons and *vufo vulgaris japonicus* exhibited inhibitory action only to a very slight extent.

The kidney factor lost its activity when the tissue extract was heated for 15 minutes in a boiling water bath. The acidification of the kidney extract at *n*/10 HCl-acidity for 5 minutes and the subsequent neutralisation with sodium hydroxide was also effective in destroying the inhibitory action. Heating and acidification were ineffectual after 60 minutes' contact of the factor with glutathione. The kidney factor was non-dialysable through collodion membrane.

At present we are of the opinion that at least two factors are operative for the inhibition of glyoxalase activity. The kidney factor (and perhaps also the pancreatic one) belongs to one of them. It reacts with glutathione in the way given above; and thus deprives glutathione of its activity as the co-enzyme of

glyoxalase. The other factor inhibits the combination between methylglyoxal and glutathione by consuming the SH-group of the latter substance. This factor is heat- and acid-stable and dialysable through collodion membrane. The autolysis-product of tissues belongs to this category.

*Behavior of glutathione during decomposition of hexosediphosphoric acid by animal tissues.*

It has been reported many times from our laboratory that hexosediphosphoric acid is decomposed into methylglyoxal, by tissues which are freed from the co-enzyme of glyoxalase. Yamazoye (1933) showed that in the presence of glutathione the methylglyoxal thus formed was converted further into lactic acid. In the meanwhile we noticed that hexosediphosphoric acid was decomposed by kidney tissue, but the formation of methylglyoxal and lactic acid was very poor (Table V).

TABLE V.  
Production of Methylglyoxal and Lactic Acid from Hexosediphosphate  
by Kidney and Other Tissues.

2 cc. tissue extract, 20.0 mg. glutathione, 150 mg. sodium hexosediphosphate and 40 cc. pH 6.2 boric acid-borax buffer were diluted to 100 cc., and incubated at 37°C. with some toluene.

Time (hours)	Substances produced (mg. %)														
	Kidney			Brain			Liver			Muscle			Bone		
	Methyl-glyoxal	Lactic acid	Free P	Methyl-glyoxal	Lactic acid	Free P	Methyl-glyoxal	Lactic acid	Free P	Methyl-glyoxal	Lactic acid	Free P	Methyl-glyoxal	Lactic acid	Free P
24	6.9	0.4	9.1	0.1	19.5	7.6	0.1	15.6	7.1	0.1	17.7	7.2	3.2	14.0	8.0
48	6.2	1.4	15.3	2.0	31.1	13.1	0.1	29.1	13.2	0.3	32.3	13.0	9.0	21.1	13.8
72	4.6	2.4	17.8	7.8	31.9	16.6	0.1	35.6	16.7	1.6	33.8	16.1	11.9	21.1	17.6

The yield of lactic acid was remarkably low even in the presence of sufficient quantity of glutathione. Only the frequent supply of glutathione was able to cause the production of lactic acid to a certain extent (Table VI).

The explanation for this unexpected result seemed first to be

TABLE VI.

## Production of Laetic Acid from Hexosediphosphate by Kidney in Presence of Large Quantity of Glutathione.

2 cc. kidney extract, 20.0 mg. glutathione, 150 mg. sodium hexosediphosphate and 40 cc. pH 6.2 boric acid-borax buffer were diluted to 100 cc. and incubated at 37°C with some toluene. 10 mg. glutathione were added to the solution every two hours during first 24 hours, after then addition was stopped.

Time (hours)	Substances present (mg. %)		
	Methylglyoxal	Laetic acid	Free P
6	0.6	2.9	1.8
24	2.2	9.5	6.1
48	3.3	12.8	9.1
22	3.2	15.7	12.4

that glutathione might be destroyed rapidly in contact with kidney tissue. However, there was no especially rapid decrease of the iodine-combining power of glutathione in kidney compared with other tissues; on the contrary, the iodine-combining power of the added glutathione tended in the kidney extract to increase markedly and then to decrease after incubating for an hour or so (see control experiments in Fig. 1 and 2, and Table I); other tissues showed a similar tendency but to a far less extent. This increase of iodine-combining power was larger when a larger quantity of kidney extract or glutathione was used. The increase of iodine-combining power in the kidney extract was observed distinctly only in the presence of glutathione. It has been stated above that the power was higher at lower acidity of the solution at the time of the glutathione determination. The power was also dependent upon the temperature; at 0°C. it showed no sign of the increase but it tended to fall gradually with the lapse of time of the incubation. Mason's ferricyanide-method (1930) of glutathione determination, Benedict's arsenophosphotungstate-method (1932-3), and the nitroprusside-method of Bierich and Rosenbohm (1933) or Fujita and Iwatake (1935) showed only a progressive decrease of glutathione. The increase of the iodine-combining power might be related to the formation of the reaction-

product between glutathione and the kidney factor.

There was also observed a striking difference between kidney and other tissues in the behavior of glutathione during the decomposition of hexosediphosphoric acid. In the case of liver, for example, the decrease of glutathione took place slowly at almost the same velocity or a little faster in the presence of hexosediphosphate than in its absence. In the case of kidney the iodine-combining power showed a very rapid fall in the first 6 hours, followed by a prompt recovery (see experiments of Series A in Table VII).

TABLE VII.  
Behavior of Glutathione during Decomposition of Hexosediphosphate by  
Kidney and Other Tissues.

Series A:—

*Exper. I.* 2 cc. kidney extract, 19.7 mg. glutathione, 150 mg. sodium hexosediphosphate and 40 cc. pH 6.2 boric acid-borax buffer were incubated at 37°C. At intervals glutathione and methylglyoxal of the solution were determined.

.. *II.* Liver extract was used instead of kidney one, other conditions being the same as Exper. I.

*Control Exper.* 2 cc. kidney extract, 19.7 mg glutathione and 40 cc. buffer were incubated, and glutathione was examined at intervals.

Series B:—

The solution was prepared in the same way as in Series A.

*Exper. I.* After 48 hours' incubation, 28.8 mg. methylglyoxal were added.

.. *II.* After 48 hours' incubation, 28.8 mg. methylglyoxal and 19.7 mg. glutathione were added.

Series A:—

Time of incuba- tion (hours)	Substances present (mg. %)				
	Exper. I		Exper. II		Control exper.
	Glutathione*	Methylglyoxal	Glutathione*	Methylglyoxal	Glutathione*
0	20.4	0	21.4	0	20.4
3	10.3	±	—	0	24.7
6	1.9	+	16.3	0	21.6
25	7.1	5.1	10.7	±	2.4
48	11.6	5.4	5.9	+	0
72	8.5	6.1	2.5	++	—

Series B:—

Time (min.)	Substances present (mg. %)			
	Exper. I		Exper. II	
	Glutathione*	Methylglyoxal	Glutathione*	Methylglyoxal
0	11.6	34.2	31.3	34.2
10	11.4	—	14.8	25.8
20	11.9	33.1	15.9	21.7
40	11.9	31.9	16.1	15.1
60	11.6	31.2	17.2	11.5

\* Iodine-combining substance as glutathione.

The rapid decrease of glutathione during the initial stage of the decomposition of hexosediphosphoric acid may be explained in the following way by considering the action of the kidney factor on glutathione. As the production of methylglyoxal from hexosediphosphoric acid takes place quite slowly, the reaction between glutathione and the kidney factor is completed by the time the formation of methylglyoxal begins. The methylglyoxal is then fixed by the reaction-product between glutathione and the kidney factor, as soon as it is produced from hexosephosphoric acid. This reaction causes the rapid decrease of the iodine-combining power of the reacting solution. The fact shown in Table VI that methylglyoxal was still continually converted into lactic acid after the stoppage of the frequent supply of glutathione may be due to the survival of free glutathione after the consumption of the kidney factor by the large quantity of glutathione.

The recovery of the iodine-combining power after 6 hours was not accompanied by the reappearance of the co-enzyme action. The results given in Exper. I of Series B of Table VII indicate that the increased iodine-combining substance did not act as the co-enzyme when methylglyoxal was supplied to the system; the added methylglyoxal and the recovered substance did not react one with other at all. That glyoxalase itself of the system was still active, was shown by the fact that the addition of fresh glutathione after 48 hours' incubation with hexosediphosphoric acid, caused

the decrease of the methylglyoxal supplied (see Exper. II of Series B of Table VII). The recovery of the iodine-combining power does not seem to be directly related to the increase which was observed, as mentioned above, during incubation of glutathione with fresh kidney extract. In the latter case the increase was accompanied soon afterwards by the decrease, while in the former case the recovery showed first the tendency of the subsequent decrease after about 48 hours. The reaction which involved the recovery during the decomposition of hexosediphosphoric acid was not of an enzymic nature. There is at present no satisfactory explanation for the increase and the recovery of the iodine-combining power in these two cases. Studies on these points are under progress.

#### SUMMARY.

1. Kidney glyoxalase differs from glyoxalase of other tissues in many ways. This abnormality of the kidney enzyme is, at least in part, due to the presence of some substance which inhibits the action of glyoxalase.

2. The mechanism of the inhibitory action of kidney constituent on glyoxalase has been studied.

The kidney factor reacts with glutathione before it manifests the inhibitory action. The reaction-product is able to combine with methylglyoxal at the same velocity as free glutathione, but the combination between these substances cannot be disrupted by the further action of the glyoxalase, while the compound between free glutathione and methyl-glyoxal is easily decomposed by glyoxalase and forms lactic acid with the simultaneous liberation of glutathione.

Addendum: According to the Journal of Biological Chemistry recently received, Woodward, Munro and Schroeder (1935) stated that the action of kidney inhibitor on glutathione did not involve the destruction of the sulphhydryl group of the latter substance, and that the iodine-combining power of glutathione increased after its incubation with kidney extract for a short time. Our findings confirm their statement in these points.

## REFERENCES.

Ariyama, N. (1928): *J. Biol. Chem.*, **77**, 359.  
Barrenscheen, H. K. and Dreguss, M. (1931): *Biochem. Z.*, **233**, 305.  
Benedict, S. R. and Gottschall, G. (1932-3): *J. Biol. Chem.*, **99**, 729.  
Bierich, R. and Rosenbohm, A. (1933): *Z. physiol. Chem.*, **215**, 151.  
Friedemann, T. E., Cotonio, M. and Shaffer, P. A. (1927): *J. Biol. Chem.*, **73**, 335.  
Fujita, A. and Iwatake, D. (1935): *Biochem. Z.*, **277**, 284.  
Girsavieius, J. O. and Heyfetz, P. A. (1935): *Biochem. Z.*, **276**, 190.  
Hunter, G. and Eagles, B. A. (1927): *J. Biol. Chem.*, **72**, 167.  
Jowett, M. and Quastel, J. H. (1933): *Biochem. J.*, **27**, 486.  
Lueas, C. C. and King, E. J. (1932): *Biochem. J.*, **26**, 2076.  
Kühnau, J. (1931): *Biochem. Z.*, **230**, 353.  
Mason, H. L. (1930): *J. Biol. Chem.*, **86**, 623.  
Platt, M. E. and Schroeder, E. F. (1934 i): *J. Biol. Chem.*, **104**, 281.  
Platt, M. E. and Schroeder, E. F. (1934 ii): *J. Biol. Chem.*, **106**, 179.  
Sakuma, F. (1930): *J. Biochem.*, **12**, 247.  
Woodward, G. E. and Fry, E. G. (1932): *J. Biol. Chem.*, **97**, 465.  
Woodward, G. E., Munro, M. P. and Schroeder, E. F. (1935): *J. Biol. Chem.*, **109**, 11.  
Yamazoye, S. (1933): *J. Biochem.*, **18**, 445.

## ÜBER DIE LEBERASPARAGINASE.

VON

YOSHINOSUKE SUZUKI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 29. September 1935)

Seit dem Lang (1904) über die leichte Spaltbarkeit des Asparagins und des Glutamins in tierischen Organismen berichtet hat, ist das Ferment, die Asparaginase, oft Gegenstand biochemischer Untersuchungen geworden. Über die Asparaginspaltung durch Hefe und andere Pilzarten sind schon viele Angaben vorhanden. Besonders ist der Versuch von Geddes und Hunter (1928) hervorragend, denen die Extraktion und Konzentrierung der Hefeaasparaginase mit schönen Resultaten geglückt ist. Kürzlich haben Grassmann und Mayr (1933) die Spezifität der Hefeaasparaginase eingehend untersucht. Nach ihrer Angabe ist der Wirkungsbereich der Hefeaasparaginase scharf begrenzt, indem Chloracetyl-, Brompropionyl-, Glycyl- oder Alanyl-Asparagin, Bernsteinsäuremonoamid und 4 isomere Oxyasparagine sämtlich von ihr nicht spaltbar waren. Unter den sonst untersuchten Substraten war ausser dem Asparagin nur das Asparaginsäurediamid in weit schwächerem Grad spaltbar, dagegen das  $\alpha$ -Asparagin überhaupt nicht. Das Glutaminspaltende Ferment soll von der Asparaginase verschieden sein. Im Gegensatz zu der pflanzlichen Asparaginase wurde das tierische Ferment nur wenig untersucht. Fürth und Friedmann (1910) haben den Asparaginabbau durch verschiedene Organe festgestellt. Die systematische Untersuchung von Clementi (1922) ergab aber, dass die Asparaginase im Tierkörper hauptsächlich in der Leber vorhanden ist. Die starke Empfindlichkeit der Asparaginase sowohl gegen Alkohol- oder Azetonzusatz wie auch gegen saure Reaktion hat eine eingehende Untersuchung des Ferments erschwert.

Als ein Teil der Forschung über die Eiweisschemie und die

Proteasen habe ich die Asparaginase der Kalbs- und Kaninchlever zur Untersuchung angezogen. Das ganze Experiment hindurch wurde die Asparaginspaltung durch die Bestimmung der bei dem Durchlüften der alkalierten Versuchslösung abdestillierten Ammoniakmenge und aus der im gleichzeitig ohne Substratzusatz angestellten Kontrollversuche erworbenen Ammoniakmenge geschätzt und in Prozentsatz ausgerechnet.

Zuerst wurde das Azetonpulver der Kalbsleber bereitet. 150 g Leber lieferten 26 g Pulver. 4 g davon wurden mit 40 ccm 50% Glycerin 24 Stunden bei Zimmertemperatur extrahiert und filtriert. Das Filtrat übte aber eine sehr schwache Asparaginhydrolyse aus. Dann wurde der Kalbsleberbrei mit gleichem Volumen 82% Glycerin gemischt, im Brutschrank von 37° 24 Stunden stehen gelassen und filtriert. Die Filtration erforderte lange Zeit und als das Filtrat im Eisschrank über Nacht aufbewahrt wurde, entstand eine mässige Trübung, die wieder durch Filtration entfernt wurde. Der so erworbene Glycerinextrakt war ziemlich stark wirksam. Ein Versuchsansatz von 5 ccm Extrakt + 5 ccm schwach alkalierten 1.5% Asparagins + 10 ccm Phosphatpuffer + 5 ccm Wasser zeigte nach 24 Stunden bei 37° und bei elektrisch gemessenem PH 7.1 eine 69%ige Asparaginhydrolyse; 15 ccm Versuchslösung lieferte 3.33 ccm N 10 NH<sub>3</sub> und 15 ccm Kontrollansatz 1.02 ccm N/10 NH<sub>3</sub>. Die mässig starke Ammoniakbildung in der Kontrolle war der Nachteil dieses Glycerinextrakts. Behandlung des Glycerinextrakts mit 1/10 Gewicht Kaolin setzte die Asparaginasenwirkung um 1/3 herab, aber ohne Verminderung der Ammoniakbildung in der Kontrolle zu bewirken. Dieser mit Kaolin behandelte Extrakt wurde mit gleichem Volumen M/10 Essigsäure versetzt, von dem entstandenen Niederschlag durch Zentrifugieren befreit und die Lösung unter Kühlung mit N Natronlauge vorsichtig neutralisiert. 5 ccm der Lösung übten in obigem Versuchsansatz bei PH 7.3 eine 37%ige Asparaginspaltung, aber die Ammoniakbildung in der Kontrolle blieb auch hoch. Als der Glycerinextrakt mit gleichem Volumen Wasser verdünnt und mit 1/10 Gewicht Kaolin eine Stunde geschüttelt und zentrifugiert wurde, verschwand in der überstehenden Flüssigkeit die Asparaginasenwirkung fast vollständig und

ausserdem war die Elution des Ferments aus dem Bodensatz selbst nach verschiedenen Verfahren sämtlich unmöglich.

Ich habe demnächst den Kalbsleberbrei in 10 fachem Volumen 1% Natriumbicarbonat unter Toluol und Chloroform Zusatz im Brutschrank von 37° 3 Tage autolysieren lassen und weiter das trübe Filtrat im Kolloidumsack gegen destilliertes Wasser 3 Tage dialysiert. Die von dem entstandenen Niederschlag abfiltrierte Lösung war wirksam und, obwohl nicht stark genug, war sie doch wegen der geringen Ammoniakbildung an den Kontrollversuchen gut dafür brauchbar die Lage des PH-Optimum zu bestimmen. Phosphatpuffer wurde gebraucht und als das nicht hinreichend die Versuchslösung zu gewünschter alkalischer Reaktion zu bringen imstande war, wurde *N* 10 Natronlauge extra hinzugefügt, wobei das Asparagin als eine Pufferkomponente an der PH-Regulierung beteiligt war. Die optimale Zone war breit, sie erstreckte sich von 7.5 bis 9 und der Mittelpunkt lagte bei PH 8.2. Falls Borat statt Phosphat als Puffer gebraucht wurde, wurde die Asparaginasenwirkung stark gehemmt.

Ich habe dann einen einfachen Presssaft der Kalbsleber hergestellt. Die Leber wurde unter Zusatz von viel Toluol und Chloroform mit Sand stark gemahlen, in Segeltuch eingepackt und in hydrotischer Presse stark gepresst. Das Gewinnen eines genügenden Saftvolumens bedarf ziemlich langer Zeit, jedoch lieferten 2000 g Leber ungefähr 300 cem trüben Presssaft, worin sich beim 24 stündigen Aufbewahren im Eisschrank ein reichlicher Niederschlag absetzte. Der davon abzentrifugierte Saft war sehr aktiv mit geringer Ammoniakbildung in dem Kontrollversuch. Haptversuch: 5 cem Saft + 5 cem 1.5% neutralisierter Asparaginlösung + 10 cem *M* 10 Phosphatpuffer + 5 cem Wasser. PH 7.3. Kontrollversuch: 5 cem Saft + 10 cem *M* 10 Phosphatpuffer + 10 cem Wasser. PH 7.3. Nach 24 Stunden wurde das gebildete Ammoniak aus 15 cem Versuchslösung abdestilliert und titriert. Hauptversuch: 6.43 cem *N* 10 NH<sub>3</sub>, Kontrolle: 0.88 cem *N* 10 NH<sub>3</sub>; Hydrolyse von 100%. Den Saft konnte man nicht ohne Inaktivierung dialysieren, weil im Kolloidumsack ein reichlicher Niederschlag entstand, der an sich eine schwache Asparaginasenwirkung behielt, und die über-

stehende Lösung fast unwirksam geworden ist. Als der Saft aber mit 1/20 Gewicht Kaolin 5 Minuten heftig geschüttelt und stark zentrifugiert wurde, beobachtete man im Zentrifugenrohr 4 Schichten. Die unterste Schicht war Kaolin, die folgende bestand aus breiiger Masse, die dritte war eine trübe Lösung und die oberste Schicht eine ölige Masse. Aus 120 ccm Saft konnte man 90 ccm Lösung von der dritten Schicht gewinnen. Diese Lösung bewirkte auch in obiger Versuchsanordnung bei  $\text{pH}$  7.7 und nach 24 Stunden 100% Hydrolyse des Asparagins, und als sie im Eisschrank unter Toluolüberschichtung aufbewahrt wurde, behielt sie ihre Aktivität über 2 Monate, aber am Ende dieser Zeit war sie für genaue Versuche nicht brauchbar, da ihre gesteigerte Viskosität eine quantitative Auspipettierung erschwerte.

Mit dieser Lösung wurde das  $\text{pH}$ -Optimum der Asparaginase bestimmt. Um eine scharf gipflende  $\text{pH}$ -Aktivitätskurve zu bekommen, brauchte ich 1 ccm Fermentlösung statt 5 cem wie in obigen Versuchen und  $M/10$  Asparaginlösung statt 1.5% (ca. 1.1  $\times N/10$ ). Die Einzelheiten werden im experimentellen Teil berichtet werden. Das optimale  $\text{pH}$  war 8.1. Dasselbe  $\text{pH}$ -Optimum wurde, wie oben erwähnt, bei dem Versuch mit dem Glycerinextrakt erhalten. Clementi und Prampolini (1930) haben die Asparaginase im Hühnerleberextrakt untersucht und durch Verfolgung der Hydrolyse mittels Formoltitration das  $\text{pH}$ -Optimum bei 7.2–7.8 beobachtet. Das von mir ermessene Optimum lag in etwas mehr alkalischer Reaktion und stimmte annähernd mit dem Ergebnis des von Geddes und Hunter (1928) an der Hefeasparaginase ausgeführten Versuchs, nämlich  $\text{pH}$  8, überein. Dass ein Ferment sowohl vom tierischen als auch pflanzlichen Ursprung mit einer gemeinschaftlichen  $\text{pH}$ -Abhängigkeit begabt ist, gilt also auch für die Asparaginase.

Das Verhalten der so hergestellten Asparaginase gegen Asparaginderivate oder überhaupt gegen Säureamide wurde dann weiter untersucht. Die geprüften Verbindungen waren 1) Glycylasparagin, 2) Benzoylasparagin, 3) Anhydroglycylasparagin, 4) Bernsteinsäure-monoamid, 5) Bernsteinsäure-diamid, 6) Harnstoff, und 7) Pyrrolidonecarbonsäureamid, und weiter 8) Glukosamin.

Um die Asparaginasenwirkung auf das Glycylasparagin zu untersuchen, muss die Fermentlösung selbstverständlich dipeptidasefrei sein. Die Dipeptidasenwirkung wurde an Glycylglyein mittels Willstätters alkoholischer Titration geprüft. Die mit Kaolin behandelte Asparaginasenlösung, die für die obige Ph-Optimumbestimmung gebraucht wurde, bewirkte selbst nach 24 und 48 Stunden keine alkoholisch-titrierbare Aziditätszunahme. Der Versuchsan-  
satz war 2 ccm Fermentlösung + 5 ccm  $M/10$  gegen Lackmus schwach alkalisierte Glycylglyeinlösung + 10 ccm  $M/10$  Phosphatpuffer + 8 ccm Wasser; Ph 7.8. Vor der Kaolinbehandlung war der Pressaft der Kalbsleber dipeptidasenhaltig: 1 ccm Saft statt 2 ccm gebraucht, sonst gleich wie bei obigem Verenich angestellt, war die Hydrolyse nach 24 Stunden 76% und nach 48 Stunden 86%. Das einmalige Behandeln des rohen Pressaftes sowohl mit Eisenhydroxyd bei Ph 4 (Acetat-Essigsäure) oder bei Ph 8 (Phosphatpuffer) wie auch mit Aluminiumhydroxyd bei Ph 6 oder 8 unter Phosphatpufferung lieferte Adsorptionsrestlösungen, die auf das Glycylglyein ebenso stark wirksam wie vor dem Behandeln waren. Also, es war nur der mit Kaolin behandelte Saft für den Versuch mit Glycylasparagin brauchbar. Ich habe denselben Pressaft neu hergestellt. 180 ccm rohen Pressafts wurden mit 18 g Kaolin eine Stunde geschüttelt, 30 Minuten stark zentrifugiert, und aus der oben erwähnten dritten Schicht erhielt ich 140 ccm Asparaginasenlösung. Ihre Unwirksamkeit auf Glycylglyein wurde wieder festgestellt. Hinsichtlich der Asparaginasenwirkung war sie wirksamer als die erstmalig hergestellte Fermentlösung. Ein Versuchsan-  
satz von 1 ccm Lösung + 5 ccm schwach alkalisierte Asparaginlösung + 10 ccm Phosphatpuffer + 9 ccm Wasser zeigte bei Ph 8 nach 24 Stunden 44.7% Hydrolyse. Dieselbe Fermentlösung war in sehr interessanter Weise auch fähig, freies Ammoniak und zwar in hohem Grad aus Glycylasparagin zu befreien. Ein Versuchsan-  
satz von 1 ccm Lösung + 5 ccm schwach alkalisierte Glycyl-  
asparaginlösung + 10 ccm  $M/10$  Phosphat + 9 ccm Wasser lieferte bei Ph 8.4 nach 24 Stunden auf das gesamte Volumen der Versuchslösung berechnet, 4.53 ccm, während die Kontrolle ohne Substratzusatz 0.28 ccm lieferte. Er ergab also einen Hydrolysengrad von

85%. Dieser Prozentsatz war deutlich grösser als der der Asparaginspaltung.

Eine Fermentlösung, die die Asparaginase enthielt aber von der Dipeptidase frei war, spaltete aus dem Glycylasparagin das Amidammoniak ab und zwar mit grösserer Geschwindigkeit als aus dem Asparagin selbst. Die Dipeptidasenfreiheit bedeutete, dass die untersuchte Fermentlösung keine messbare Hydrolyse des Glycylglycins ausübte. Bekanntlich schwankt die Aktivität der Dipeptidase nach den Arten der Dipeptide und ausserdem kommt wohl das Aktivitätsverhältnis bei der Hydrolyse von zwei Arten Dipeptide je nach dem Gehalt des präformierten oder künstlich zugesetzten Hemmungskörpers mehr oder weniger verschieden heraus. Man könnte daher voraussetzen, dass das Glycylasparagin unter der Versuchsbedingung, wo das Glycylglycin wohl nicht spaltbar war, doch zuerst in Glycin und Asparagin fermentativ aufgespalten worden war. Aber um die raschere Ammoniakbildung bei dem Glycylasparagin als bei dem Asparagin zu erklären, muss man ausser der extremen Verschiebung des Aktivitätsverhältnisses bei der dipeptidischen Hydrolyse von den beiden Verbindungen noch eine andere Voraussetzung zulassen, nämlich die, dass das freigemachte Asparagin in der sogenannten naszierenden Form fermentativ leichter als das zugesetzte Asparagin spaltbar sein mag. Solche Voraussetzung wäre jedoch bei einer so indifferenten Substanz wie das Asparagin zu weitgehend. Es soll hierbei vielmehr die primäre Amidammoniakspaltung angenommen werden.

Der Einfluss der Azidität des Mediums auf die Ammoniakabspaltung aus Glycylasparagin wurde demnächst untersucht. Dafür wurde die Fermentlösung 5/3 fach verdünnt, und 1 ccm davon wurde in gleicher Weise wie bei dem obigen Versuch gebraucht, weil mit dieser verdünnten Lösung scharfes Gipfeln der optimalen Zone zu erwarten war. Das Optimum war  $\text{pH}$  8 und bei dieser Azidität wurden 70% gesamten Amidammoniaks losgelöst. Einzelne Zahlen sind im experimentellen Teil angegeben.

Das Benzoylasparagin wurde von der Fermentlösung nicht angegriffen, noch wurden Bernsteinsäure-monoamid, Bernstein-säurediamid und der Harnstoff von ihr nicht gespalten.

Die Ammoniakabspaltung wurde dann bei dem Anhydroglycyl-asparagin und Pyrrolidonecarbonsäureamid untersucht. Diese Verbindungen sind nach dem Experiment von Ishiyama (1933) gegen proteolytische Fermente resistent. Ich konnte aber, wie im experimentellen Teil berichtet, 16% Abspaltung des Amidammoniaks aus Anhydroglycylasparagin bei PH 9.1 und 31% Abspaltung aus Pyrrolidonecarbonsäureamid bei PH 8 beobachten. Diese beiden Aziditätsgrade waren die respektiven PH-Optima. Es ist aber sehr fraglich, ob diese Hydrolyse durch die eigentliche Asparaginase verursacht wurde, weil, wie nachher erwähnt, ein Leberextrakt hergestellt werden konnte, der das Asparagin in gleicher Weise wie jener Leberpresssaft stark und bei PH 8.1 optimal zu spalten vermochte, aber auf das Pyrrolidonecarbonsäureamid ganz und gar unwirksam war. Daher sollte der Wirkungsbereich der tierischen Asparaginase lieber spezifisch auf Asparagin beschränkt werden; dann ist die Ammoniakabspaltung aus jenen zwei Verbindungen vermutlich einem anderen Ferment zuzuschreiben. Es gibt jedoch auch die Möglichkeit, dass diese Reaktion nicht direkt an den Verbindungen sich abspielte, sondern dass die Hydrolyse der CO-NH-Bindung in Diketopiperazin- und Pyrrolidonring vorangegangen war und das gebildete Glycylasparagin und Glutamin von dem Amidspaltenden Ferment angegriffen wurde. Ich kann diese Möglichkeit vorläufig nicht ausschliessen, aber wenn es der Fall wäre, dann ist die CO-NH-Hydrolyse in jenen heteroeyklischen Ringen durch irgendein Organferment an sich selbst sehr merkwürdig, weil die beiden Verbindungen, wie erwähnt, gegen die Proteasen als widerstandsfähig wohl bekannt sind.

Das Glukosamin wurde durch dieselbe Fermentlösung leicht gespalten. In der obigen Versuchsanordnung konnte beinahe 90%ige Desaminierung beobachtet werden.

Ich habe dann die Extraktion der Leberasparaginase weiter untersucht. Um das frische Organ nach Bedarf beliebig gleich bearbeiten zu können, wurde Kaninchenleber als Material zur Herstellung der Asparaginase gebraucht. Nach verschiedenen Versuchen wurde beobachtet, dass die Extraktion bei niedriger Temperatur ausgeführt werden musste und als Extraktionsmittel

dabei Glycerin oder in interessanter Weise 10%ige Rohrzuckerlösung geeignet waren, indem zu dem Organbrei 2 Volumina des Extraktionsmittels und einige ccm Toluol als Antisepticum zugesetzt wurden und der Extrakt nach einem Tag von dem Bodensatz abzentrifugiert wurde. Die Extraktion des Leberbreis mit Wasser oder Salzlösung lieferte eine nur schwache Asparaginasenlösung. Die hergestellten Extrakte mussten überhaupt im Eisschrank aufbewahrt werden, sonst fand die spontane Inaktivierung rascher statt. Das PH-Optimum der Asparaginspaltung wurde mit dem Rohrzuckerextrakt untersucht und wieder bei PH 8.1 gefunden. Diese Fermentlösung enthielt eine starke Dipeptidase und hydrolysierte das Glycylglycin in oben erwähnter Versuchsanordnung 90% nach 24 Stunden. Daher wurde ihre Wirkung hinsichtlich der Ammoniakabspaltung aus dem Glycylasparagin nicht weiter untersucht. Diese Asparaginasenlösung war unwirksam auf das Pyrrolidonecarbonsäureamid. Die Versuche wurden bei verschiedenen Aziditäten PH 7.3–8.7 angestellt, aber keine Ammoniakbildung war nachzuweisen. Das Pyrrolidonecarbonsäureamid ist also durch die Asparaginase nicht hydrolysierbar, wohl aber, wie oben erwähnt, durch die Organfermente. Der Glycerin- oder Rohrzuckerextrakt der Kaninchenleber behielt trotz des Aufbewahrens im Eisschrank seine Asparaginasenwirkung nicht lange, und nach einigen Tagen wurde sie dadurch mindestens auf die Hälfte inaktiviert. Dialyse gegen Wasser oder Salzlösung liess die Fermentwirkung verschwinden. Das Behandeln des Extraks mit verschiedenen Adsorptionsmitteln führte bloss zum Verlust der Asparaginase. Ich konnte aber durch das folgende Verfahren die Stabilität der Asparaginase steigern. Dem Extrakt wurde 1/4 Volumen je  $M/10$  Bleiacetat und dann  $M/10$  primäres Kaliumphosphat hinzugefügt und nach 20 Minuten wurde der Niederschlag abzentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit diente zum Versuch. Die Asparaginasenwirkung wurde durch dieses Behandeln nicht geschwächt. 5 ccm in obiger Versuchsanordnung gebraucht, bewirkte bei PH 7.8 nach 24 Stunden beinahe 100% Hydrolyse des Asparagins. Die Aktivität der Lösung blieb, in der Kälte aufbewahrt, über eine Woche unverändert.

Das Experiment ergab also die Herstellung von zwei brauchbaren Asparaginasenlösungen; der mit Kaolin behandelte Presssaft der Kalbsleber und der mit dem Bleiverfahren stabilisierte Glycerin- oder Rohrzuckerextrakt der Kaninchenleber. Beiden war ein pH-Optimum gemeinsam, nämlich 8.1. Mit der ersten Fermentlösung wurde die Hydrolyse des Glycylasparagins, Anhydroglycylasparagins, Pyrrolidoncarbonsäureamids und Glukosamins beobachtet. Der Hydrolysenmechanismus dieser Verbindungen wurde schon oben besprochen.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

##### 1. Substrate.

- a) Asparagin von Merck.
- b) Glycylglycin, dargestellt über Chloracetylglycin.
- c) Glycylasparagin, ebenfalls nach Fischer (1904) über Chloracetylasparagin dargestellt, bildete feine Nadeln.
- d) Benzoylasparagin wurde in folgender Weise bereitet.

26 g Asparagin wurden in der Kälte in 210 ccm *N* Natronlauge gelöst und darin wurden unter weiterem Abkühlen portionsweise und abwechselnd 20 g in 100 ccm Äther gelösten Benzoylchlorids und 110 ccm 2 *N* Natronlauge hinzugefügt, indem bei jedem Zusatz das Reaktionsgefäß stark geschüttelt wurde. Nach dem Verschwinden des Chloridgeruchs entfernte man die ätherische Schicht und die alkalische wässrige Lösung wurde mit Salzsäure gegen Kongo angesäuert, wobei das Benzoylasparagin zusammen mit Benzoesäure ausfiel. Die Benzoesäure wurde mit Äther abgewaschen und das Benzoylasparagin aus heißem Wasser oder besser aus heißem Alkohol umkristallisiert. Schmelzpunkt 189–190°.

- e) Anhydroglycylasparagin wurde nach Fischer und Königs (1904) dargestellt.
- f) Pyrrolidoncarbonsäureamid war das Präparat von Ishiyama (1933).
- g) Bernsteinsäure-monoamid wurde nach der Angabe von Hoogewerff und van Dorp (1899) aus Bernsteinsäure-anhydrid und konz. Ammoniak dargestellt und aus Wasser umkristallisiert. Schmelzpunkt 154°.

- h) Bernsteinsäure-diamid von Takeda.
- i) Harnstoff von Merck.
- j) Glukosamin-chlorhydrat von Kahlbaum.

### 2. Versuchsanordnung.

Die Zusammensetzung der Versuchslösungen wurde schon oben einzeln angegeben. PH wurde jedesmal an den Versuchslösungen gleich nach dem Anstellen der Versuche elektrisch gemessen. Das ganze Experiment hindurch war die Versuchstemperatur 37°. Das abgespaltene Ammoniak wurde nach Folin bestimmt; nämlich es wurde ein bemessenes Volumen der Versuchslösung mit Kaliumcarbonat alkalisch gemacht und das freie Ammoniak bei 50° in die M/10 Schwefelsäure abdestilliert. Die alkoholische Titration nach Willstätter wurde mit 0.2 N alkoholischer Kalilauge ausgeführt.

### 3. Ergebnisse.

a) Bestimmung der optimalen Azidität der Asparaginase. Die Fermentlösung war der mit Kaolin behandelte Presssaft der Kalbsleber.

**1 cem Fermentlösung**

5 „ M/10 gegen Lackmus neutralisierte Asparaginlösung

10 „ Puffer

9 „ Wasser

Kontrollversuch: mit 5 cem Wasser statt Asparaginlösung. Als der Puffer nicht hinreichend war, um die erwünschte Alkalität herzustellen, wurde M/10 Natronlauge hinzugefügt und dementsprechend wurde das Volumen des Wassers verringert. Versuchsdauer 24 Stunden. Ammoniakbestimmung an 15 cem Lösung. In der folgenden Tabelle wird die Ammoniakmenge für 25 cem Lösung umgerechnet. Resultat; s. Tabelle I.

b) Ammoniakabspaltung aus Glycylasparagin. Die Fermentlösung war wie beim obigen Versuch der mit Kaolin behandelte Presssaft. Gleich vor der Anstellung der Versuche wurden 6 Volumina des Presssafts mit 4 Volumina Wasser verdünnt. Die Versuchsanordnung war gleich der des vorigen Versuchs. Das Resultat wird in der Tabelle II angegeben.

**1 cem verdünnte Fermentlösung**

5 „ M/10 Glycylasparagin

10 ccm Puffer

9 „ Wasser

TABELLE I.

Ph.	ccm N/10 NH <sub>3</sub>		Hydrolyse in %
	Hauptversuch	Kontrollversuch	
8.70	1.51	0.38	23.5
8.37	1.73	0.33	28.0
8.10	2.05	0.38	33.2
7.95	1.72	0.31	28.1
7.79	1.56	0.32	24.7
7.70	1.56	0.34	24.2
7.65	1.49	0.36	22.5
7.56	1.45	0.36	21.7
7.38	1.32	0.31	20.1
7.25	1.28	0.33	19.1
7.07	1.24	0.40	16.7
6.79	0.93	0.32	12.1

TABELLE II.

Ph.	ccm M/10 NH <sub>3</sub>		Hydrolyse in %
	Hauptversuch	Kontrollversuch	
9.23	0.60	0.18	8.2
8.76	1.95	0.12	34.7
8.59	3.00	0.21	55.7
8.42	3.58	0.22	66.1
8.29	3.61	0.20	68.1
8.13	3.68	0.23	69.0
7.94	3.80	0.23	71.2
7.87	3.59	0.18	68.1
7.79	3.45	0.18	65.2
7.74	3.42	0.20	64.2
7.55	3.36	0.16	63.9
7.32	2.06	0.16	38.0
7.14	1.29	0.21	21.7
6.89	0.38	0.21	5.2
6.68	0.34	0.21	2.5

c) Ammoniakabspaltung aus Anhydroglycylasparagin. Die verdünnte Fermentlösung wie bei dem b) Versuch wurde gebraucht. Die Versuchsanordnung auch gleichfalls wie bei b).

PH	cem N/10 NH <sub>3</sub>		Hydrolyse in %
	Hauptversuch	Kontrollversuch	
9.41	0.59	0.18	6.2
9.12	1.02	0.20	16.2
8.94	0.86	0.16	14.0
8.80	0.83	0.21	12.2
8.71	0.67	0.21	9.1
7.62	0.34	0.12	4.2

d) Ammoniakabspaltung aus Pyrrolidoncarbonsäureamid. 1 cem Pressaft wurde unverdünnt gebraucht, sonst war die Versuchsanordnung gleich wie oben.

PH	cem N/10 NH <sub>3</sub>		Hydrolyse in %
	Hauptversuch	Kontrollversuch	
9.61	0.85	0.18	13.1
9.27	1.05	0.27	16.5
8.42	1.67	0.21	29.1
8.26	1.78	0.24	30.7
8.08	1.83	0.26	31.2
7.74	1.41	0.19	24.2
7.51	1.26	0.22	20.7
7.03	1.16	0.26	18.0

e) Hydrolyse des Glukosamins. Glukosaminchlorhydrat wurde mit Kalilauge gegen Lackmus schwach alkalisiert und M/10 Lösung damit bereitet. 1 cem unverdünnten Pressafts wurde gebraucht, sonst wie oben.

PH	cem N/10 NH <sub>3</sub>		Hydrolyse in %
	Hauptversuch	Kontrollversuch	
9.19	1.00	0.25	15,0
8.05	8.86	0.32	70.7
7.42	4.75	0.31	88.7
7.10	1.55	0.29	25.1
7.00	1.36	0.29	21.2

## LITERATUR.

Clementi, A. (1922): Arch. internat. Physiol., **19**, 369.  
Clementi, A. u. Prampolini, P. (1930): Ber. ü. ges. Physiol., **52**, 484.  
Fischer, E. u. Königs, E. (1904): Ber. chem. Ges., **37**, 4585.  
Fürth, O. v. u. Friedmann, M. (1910): Bioch. Z., **10**, 435.  
Geddes, W. F. u. Hunter, A. (1928): J. Biol. Chem., **77**, 197.  
Grassmann, W. u. Mayr, O. (1933): Z. f. physiol. Chem., **214**, 185.  
Hoogewerff, S. u. van Dorp, W. A. (1899): Chem. Zentralblatt, II,  
864.  
Ishiyama, T. (1933): J. Biochem., **17**, 285.  
Lang, S. (1904): Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol., **5**, 320.



## EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS AUFTREten DER RACHITIS.

**Das Auftreten der Rachitis bei Gallosterin als Lieferquelle  
des Vitamin A und normaler Proportion des Phosphor-  
und Calciumgehalts der gebrauchten Salzmixtur.**

VON

SHIZUO MURAO.

(Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Akademie Kumamoto.  
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 2. September 1935.)

### EINLEITUNG.

Die Butter, der Lebertran oder die käuflichen Vitamin A Präparate etc., welche bisher in den Tierversuchen als Lieferungsquelle des Vitamin A Anwendung fanden, enthalten immer mehr oder minder ebenfalls das fettlösliche Vitamin D, so dass dadurch die Untersuchungen irregeführt wurden. Da haben sich Takahashi (1923) und die anderen zahlreichen Forscher bemüht, das Vitamin A im Wesen klarzustellen oder es zu isolieren, das hat zwar auf diese Frage ein Licht geworfen, aber die praktisch einfach brauchbaren Präparate wurden uns nicht zur Verfügung gestellt. Dann gelang es Shimizu (1929 a), die Krystalle einer Verbindung von Vitamin A und Desoxycholsäure darzustellen und er benannte sie Gallosterin. Da wollte ich für den Versuch, die Rachitis experimentell auftreten zu lassen, als Lieferant des Vitamins A im D-avitaminotischen Füttern bei Tierexperimente dieses Gallosterin verwenden.

### I. VERSUCHSMATERIAL UND VERSUCHSMETHODE.

Als Versuchstiere dienten 30-40 g schwere gut ernährte weisse Ratten. Jedes von ihnen wurde in einem Käfig gefüttert, welcher, damit die Beobachtung von aussen bequem möglich war, aus metallenen Netzen besteht. Die Fäzes konnten leicht hindurch-

gehen, so dass die Tiere vor Kotfressen bewahrt wurden. Am Boden des Käfigs war ein seichter Kasten aus verzinktem Eisenblech so angebracht, dass er bequem verschoben und gereinigt werden konnte.

Standardfutter. Dasselbe wurde nach Saiki und Fujimaki (1928) folgendermassen zusammengestellt:

Kasein	18%
Dextrin	66%
Olivenöl	7%
Hefe	2%
Lebertran	3%
Daikon (grosse weisse Rübe)	eine kleine Menge
Wasser	quantum satis
Gemisch von anorganischen Salzen	4%

Von den anorganischen Salzen wurden solche von nach Saiki und Fujimaki (1928) verbessertem Rezept und die Präparate "Merck" gebraucht.

NaCl	6,5%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10,0%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30,0%
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	13,0%
Ca-Lactat	37,0%
Fe-Citrat	3,0%
KJ	spur

Das Futter wurde auf folgende Weise rein dargestellt: Das Kasein und das Dextrin (Präparate der japanischen Pharmakopöe gebraucht) wurden mit dem 2-3 fachen Volumen 95%igen Alkohols auf dem Wasserbade warm extrahiert, dann filtriert, gespült und getrocknet, darauf mit dem 2-3 fachen Äther 12 Stunden lang geschüttelt, gespült und getrocknet. Das Olivenöl (nach der japanischen Pharmakopöe), wenn auch angenommen wird, dass es kein Vitamin A u. D enthält, wurde vorsichtshalber auf dem Glycerinbade bei um 180° herum gehalten, bei fortwährendem Umrühren 12 Stunden lang erhitzt. Hefe, die durch den guten

Willen der Nippon-Bier-Gesellschaft zu Fukuoka erhalten wurde, wurde mit einer grossen Menge kalten Wassers versetzt, genügend umgerührt und stehen gelassen, mehrere Stunden danach durch ein seideses Tuch von Hopfenrückstand befreit, die hindurchgegangene Hefe durch Buchner's Trichter filtriert, durch Lüftung getrocknet, dann mit Äther ausgezogen, bis der Auszug nicht mehr die Färbungsreaktion von Vitamin A und Cholesterin zeigte, dann wieder getrocknet und pulverisiert.

Es wurde von den Entwickelungsapparaten der X-Strahlen die bei Sanitas und Co. (Deutschland) hergestellte, Nr. Trifas und von den Röntgenröhren die bei Siemens-Reiniger u. Co. hergestellte Coolidge'sche mit Wasserabkühlungsvorrichtung gebraucht. Die Aufnahmeverhältnisse waren folgende: Röhre-Filmabstand = 110 cm, die maximale sekundäre elektrische Spannung = 46 K. V., sekundärer elektrischer Strom = 20 M. A. und die Zeitdauer = 0,5 Sek.

## II. VERSUCHSERGEBNISSE.

### *Versuch I. Einfluss der Desoxycholsäure.*

Wie schon erwähnt, ist zwecks der Studien zur Untersuchung des experimentellen Auftreten der Rachitis ein solches Futter notwendig, dass die vollkommenen Salze enthält und nur vom Vitamin D frei ist. Für diesen Zweck wollte ich als Lieferungsquelle des Vitamin A das Gallosterin anwenden; aber zuvor beobachtete ich den Einfluss eines Bestandteiles des Gallosterins, der Desoxycholsäure. Nach Shimizu und Hatakeyama (1929 b) ist für die Maus resp. weisse Ratte 0,3–0,42 mg resp. 0,3–0,5 mg Gallosterin pro die eine physiologisch geeignete Dosis. Werden diese Dosen in den Gehalt an Desoxycholsäure umgerechnet, so resultiert 0,25–0,5 mg. Danach habe ich vom desoxycholsauren Natrium täglich 0,4 mg und als überschüssige Menge 1,6 mg zum Normalfutter hinzugefügt und die Beeinflussung dadurch beobachtet. Bei jeder Gruppe der Tiere wurde einen Tag um den andern das Körpergewicht bestimmt und immer auf ihre klinischen Symptome wie das Benehmen, Zu- und Abnahme der Futtereinnahme und den

Zustand ihrer Haare meine Aufmerksamkeit gerichtet, 100 Tage lang gefüttert, dann getötet und obduziert. Andererseits wurde das Röntgenbild aufgenommen.

1. Gruppe. Mit Normalfutter gefüttert. Tiernummer: 50♂, 49♀.

Die Tiere dieser Gruppe zeigten regelmässige Körpergewichtszunahme. Es erreichte am 90. Tage Nr. 50 165 g und Nr. 49 135 g. Die beiden Tiere waren während des ganzen Verlaufs recht gesund und liessen gar keine abnormen Obduktionsbefunde erkennen, haben also, wie ich glaube, sogenanntes Normalwachstum vollendet.

Anmerkung. Auch in dem nachher zu besprechenden 2. und 3. Versuche wurde als Kontrollversuch die Fütterung mit Normalfutter angestellt, die Resultat stimmten mit denen des 1. Versuches überein. Deshalb werden sie nur auf der Figur gezeigt.

2. Gruppe. Die Tiere wurden mit Normalfutter mit Zusatz von 0,4 mg desoxycholischen Natriums pro die ernährt. Tiernummer: 48♂, 47♂, 46♀.

Bei dieser Gruppe erfolgte die Körpergewichtszunahme wie bei der ersten immer regelmässig.

3. Gruppe. Die Tiere wurden mit Normalfutter, zu dem 1,6 mg desoxycholischen Natriums pro die hinzugesetzt war, ernährt, Tiernummer: 45♂, 44♀, 43♀.

Die Tiere nahmen im Körpergewicht beinahe regelmässig zu und am 90 Tage waren Nr. 44 u. 43 um ca. 15 g und Nr. 45 weniger schwer im Vergleich mit dem Normalgewicht. Sie zeigten keine klinischen und keine obduktiven Befunde. Meiner Meinung nach wirkt das desoxycholare Natrium in der betreffenden Dosis gegeben einigermassen auf die Entwicklung hemmend.

4. Gruppe. Die Fütterung der Tiere erfolgte mit Futter, dem das fettlösliche Vitamin mangelte, zu dem 0,4 mg desoxycholischen Natrium pro die zugesetzt war. Tiernummer: 42♂, 41♀, 40♀.

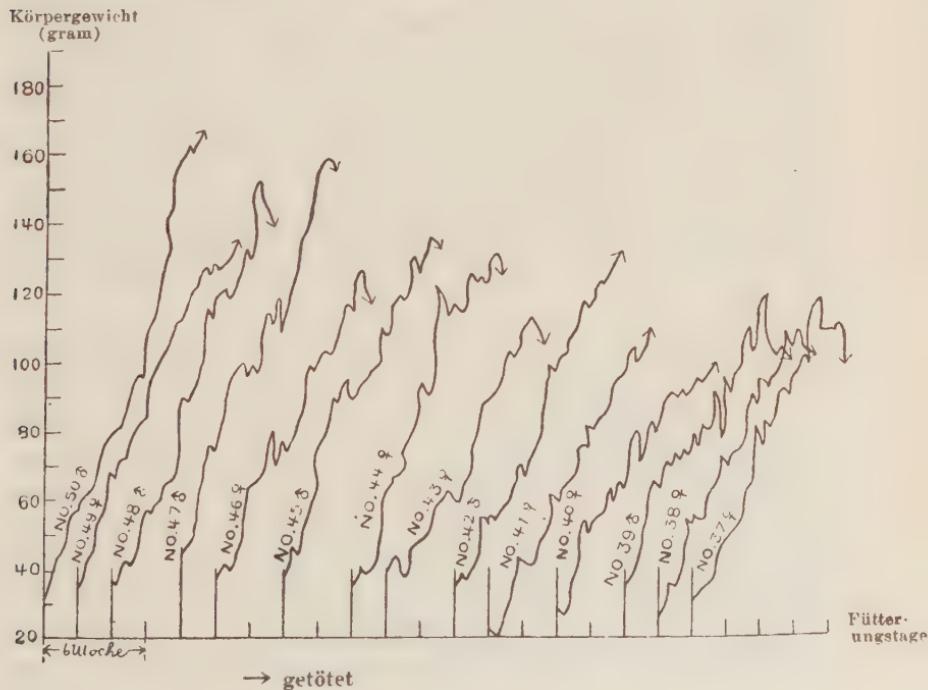
Die Tiere zeigten eine fast regelmässige Körpergewichtszunahme, waren am 90. Tage Nr. 41 u. 40 um ca. 14 g und Nr. 42 um 25 g leichter im Vergleich mit dem Normalgewicht, aber von den klinischen und obduktiven Befunden ist nichts anzuführen.

5. Gruppe. Die Tiere wurden mit Futter, dem fettlösliche

Vitamine mangeln, mit Zusatz von 1,6 mg desoxycholsauren Natriums pro die ernährt. Tiernummer: 39♂, 38♀, 37♀.

Das Körpergewicht vermehrte sich fast regelrecht. Im Endstadium des Versuches war das Körpergewicht bei Nr. 38 u. 37 um ca. 20 g und bei Nr. 39 um ca. 40 g kleiner als das Normalgewicht. Die klinischen und obdektiven Befunde waren frei von auffallenden Veränderungen. Gegenüber der 4. Gruppe zeigt am Ende des Versuches das Körpergewicht vom Männchen eine Abnahme von 5 g, was wohl eine Folge davon ist, dass die 4 fache Dosis von desoxycholsaurem Natrium gegeben wurde. Shimizu und Hatakeyama (1929 b) fanden bei Mäusen, dass sie, als diese Autoren ihnen vollkommenes Futter mit Zusatz von 0,25 mg desoxycholsauren Natriums pro die gaben, normale Entwicklung zeigten, während die Gruppe, die täglich Futter, dem das Vitamin mangelte, mit Zusatz von 0,25 mg Desoxycholsäure bekam, von Diarrhöe

Fig. 1.



befallen wurde und schnell an Körpergewicht abnahm. Die Mäuse starben alle innerhalb einer Woche. Als Sektionsbefunde stellten sich Lungenentzündung und Darmkatarrh dar, sonst an anderen Organen keine Veränderungen. Die Todesursache wurde teilweise in der Giftigkeit der Desoxycholsäure gesucht und es wurde der Schluss gezogen, dass die Säure beim vollkommenen Futter unschädlich, aber bei der A-avitaminotischen Kost schädlich ist.

Nach meinen Resultaten zeigte sich bei der Kost, welcher fettlösliche Vitamine mangelten, eine bestimmte Entwicklung. Bei Betrachtung des Röntgenbildes, stellten sie kein besonderes Bild dar. Der die Entwicklung des Tieres hemmende Einfluss des desoxycholsauren Natriums scheint proportional seiner Dosis zu sein, während er aber beim vollkommenen Futter leichten Grades ist.

### *Versuch II. Einfluss des Ergosterins.*

Nach Hess und Windaus (1926) wirkt das bestrahlte Ergosterin auf die Rachitis weisser Ratten in Dosen von unter 0,003 mg pro die, nach Rosenheim u. Webster (1927) in Dosen 0,0001 mg pro die gut heilend. Auch von Collazo, Rubine und Varela (1929) wird berichtet, dass die weissen Ratten bei der Fütterung mit 5 mg aktivierten Ergosterins pro die an Körpergewicht und Körpertemperatur abnehmen, in der Entwicklung verschlechtert werden, verwirrte Haare, Unlebhaftigkeit, Lähmung der vier Extremitäten und Atrophie von Leber, Milz, Pankreas etc. aufweisen.

Nach Hess und Windaus (1926) versetzte ich das Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, und die Normalkost mit der für eine weisse Ratte physiologisch geeigneten täglichen Dosis (0,002 mg) bestrahlten Ergosterins und mit der als überschüssige Dosis angesehenen 4–8 mg desselben und habe darauf untersucht, ob das erstere die A-Avitaminose hervorruft und im letzteren Falle irgendeine Störung resultiert. Auch mit dem Überschuss nicht bestrahlten Ergosterins führte ich den Versuch aus. Das von mir gebrauchte Ergosterin war das bei Dr. Fraenkel u. Co. (Deutschland) hergestellte, dessen 0,01 mg eine Färbungsreaktion mit

Trichloressigsäure nach Rosenheim (1929) positiv ausfallen lässt, und das bei 160–161° schmilzt.

Die Bestrahlung erfolgte durch die Giba-Quecksilberlampe (Kromayersch B-Form mit Wasserabkühlungsvorrichtung), die bei Tokyo Dento Kabushiki Kaisha (Electrische Gesellschaft) hergestellt wurde. Dabei wurden 100 Volt und 3 Amp. gebraucht und es war der Abstand 30 cm und die Strahlungsdauer 5–15 Minuten. Von Ergosterin wurde eine geringe Menge in Olivenöl gelöst, in ein mit Stickstoffgas gefülltes Reagenzrohr aus Quarz hineingetan.

1. Gruppe. Mit Standardfutter ernährte Tiere. Tiernummer: 3δ, 4♀.

Notiz der Resultate ist dem Absatz des ersten Versuches gleich.

2. Gruppe. Tiere, gefüttert mit Standardkost, zu der 4 mg Ergosterin pro die zugesetzt waren. Tiernummer: 36δ, 35♀.

Die Tiere zeigten alle wie bei der Standardkost regelmässige Körpergewichtszunahme.

Die klinischen und obduktiven Befunde liessen nichts Abnormes erkennen.

3. Gruppe. Die Tiere wurden mit Standardfutter mit Zusatz 5 Minuten lang bestrahlten Ergosterins gefüttert. Tiernummer: 34δ, 33♀.

Die Tiere nahmen alle wie die der zweiten Gruppe regelmässig an Körpergewicht zu. Von den klinischen und obduktiven Befunden gab es nichts Anführenswertes.

4. Gruppe. Tiere, gefüttert mit Standardfutter, zu dem 4 mg 15 Minuten beleuchteten Ergosterins pro die hinzugefügt waren. Tiernummer: 32δ, 31♀.

Resultate waren gleich solchen der vorigen Gruppe.

5. Gruppe. Tiere, ernährt mit dem Futter, dem fettlösliche Vitamine mangelt, zu dem 4 mg Ergosterin pro die zugesetzt waren. Tiernummer: 30δ, 29♀.

Während der 40 tägigen Fütterung zeigte sich eine langsame, aber noch regelmässige Körpergewichtszunahme, danach stand aber die Entwicklung still und nach etwa 60 Tagen kamen Augensymptome wie Tränenfluss, vermehrtes Sekret etc. zum Vorschein,

ferner wurden die Haare grob und starr, es zeigte sich Abmagerung und um 70–80 Tage nach Beginn der Fütterung erfolgte der Tod. Bei der Obduktion liessen sich Blutung aus der Magenschleimhaut und Lungeninfiltration nachweisen.

*6. Gruppe.* Fettlösliches avitaminotisches Futter mit Zusatz von 4 mg 5 Minuten durchstrahlten Ergosterins pro die diente zur Fütterung der Tiere. Tiernummer: 28♂, 27♀.

Wie bei der fünften Gruppe brachte die 30–40 tägige Fütterung eine langsame doch regelmässige Körpergewichtszunahme. Danach stellte sich der Entwickelungsstillstand ein und am ca. 40.–50. Tage auch Augensymptome wie Tränenfluss, Bindehauthyperämie etc., Beginn der Körpergewichtsabnahme, Grobstarrwerden der Haare, Abmagerung und innerhalb von 80 Tagen trat der Tod ein. Die Obduktionsbefunde bestanden in Blutung aus der Magenmucosa und Lungeninfiltration.

*7. Gruppe.* Tiere, gefüttert mit dem Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, zu dem 4 mg 15 Minuten beleuchteten Ergosterins pro die hinzugefügt waren. Tiernummer: 26♂, 25♀.

70–80 Tage lang nahm das Körpergewicht ziemlich regelmässig zu, fing aber danach an abzunehmen, zugleich setzten Augensymptome wie Tränenfluss, Sekretvermehrung, Hyperämie etc. ein. Die Haare wurden grob und starr. Die Tiere kratzten das Futter aus und benahmen sich so, als ob sie beißen wollten, magerten ab und gingen in 80–100 Tagen zugrunde; und bei Nr. 25 zeigte sich Blutung aus der Nasenhöhle und Genitalschleimhaut. Bei der Obduktion liess die rechte Niere im unteren Drittel an der Rinde hirsekorngrösse kalkartige Ablagerung erkennen, war auch an den Rändern hyperämisch, auch die linke an der Rinde ebenfalls. Weiter war die Blase mit Harn voll gefüllt, zeigte bei der Inzision 13 hirsekorngrösse Harnsteine und sein Ausgang war mit azukibohnengrossen Harnsteinen verstopft; die Gewebe in der Umgebung der Blasen waren vereitert. Fujimaki (1928) teilte mit, dass von 44 weisen Ratten, denen er 30–100 Tage lang das Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, gegeben hatte, 16 Fälle (36%) Blasenstein aufwiesen. Auch waren die beiden Lungen an der Oberfläche mit kalkartigen Ablagerungen versehen, scheinen im

allgemeinen atrophiert zu sein.

8. Gruppe. Tiere, gefüttert mit Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, zu dem 0,002 mg 5 Minuten durchleuchteten Ergosterins pro die hinzugefügt war. Tiernummer: 24♂, 23♀.

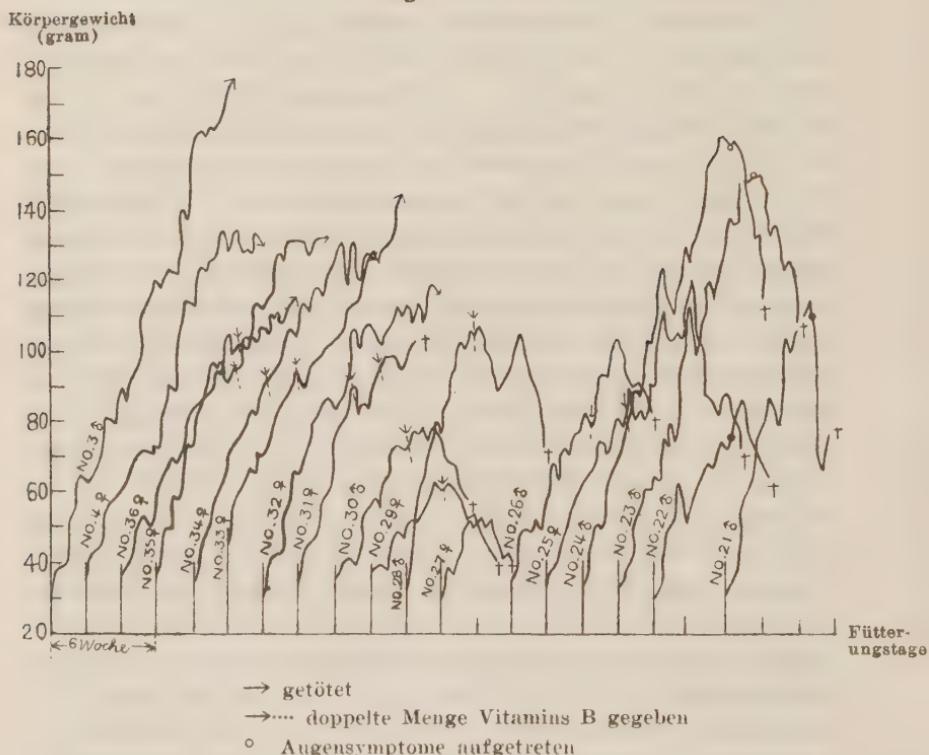
Bei 80 tägiger Fütterung zeigte sich eine regelmässige Körpergewichtszunahme, die der bei der Standardkost fast gleich war. Bald danach traten an den Augen Symptome wie Tränenfluss, vermehrtes Sekret, Bindegauhyperämie etc. auf. Das Körpergewicht verminderte sich allmählich, die Haare wurden grob und starr, der Körper magerte ab und innerhalb von 100 Tagen nach Beginn der Fütterung starben alle Tiere. Bei der Sektion fanden sich Blutung aus der Magenmucosa und Lungeninfiltration.

9. Gruppe. Tiere, gefüttert mit Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, mit Zusatz von 0,002 mg 15 Minuten bestrahlten Ergosterins pro die. Tiernummer: 21♂, 22♀.

Vierzig Tage lang vermehrte sich das Körpergewicht fast regelrecht. Aber bald danach wurden wie bei der achten Gruppe Augensymptome wie Tränenfluss, Sekretzunahme, Conjunctivalhyperämie etc. hervorgerufen; mit der Körpergewichtsabnahme wurden die Tiere im Benehmen unlebhaft, bekamen grobe und starre Haare, magerten ab und starben nach über 50 Tagen. Bei der Obduktion liessen sich Blutung aus der Magenschleimhaut, Infiltration, azukibohnengrosser Abszess und mehrere kalkartige Ablagerungen der Lunge erkennen.

Den zweiten Versuch zusammenfassend kann man sagen: Wird auch das Standardfutter mit Zusatz vom 4-8 mg 5-15 Minuten durchstrahlten Ergosterins pro die gegeben, so wird ein fast normales Wachstum vollendet. Bei der Verabreichung des fettlöslichen avitaminotischen Futters mit gleichem Zusatz stellen sich Symptome ein, die solchen bei der Kost. der fettlösliche Vitamine mangeln, analog sind. Nach der 70-80 tägigen Fütterung gingen alle Tiere zugrunde. Meine Fälle, wo bei 4-8 mg die Tiere über 3 Monate lang am Leben blieben, scheinen mit dem von Collazo (1929) berichteten Erfolg der Darreichung von 5 mg pro die annähernd im Einklang zu stehen.

Fig. 2.



### Versuch III. Beeinflussung durch das Gallosterin.

In diesem Versuche wurde beobachtet, ob bei Zusatz von Gallosterin, beleuchtetem Ergosterin, Biosterin "Riken" (ein Japanisches Präparat) und Vigantol zu einem fettlöslichen avitaminotischen Futter Normalwachstum vollendet wird, was für ein Einfluss bei der Darreichung einer überschüssigen Menge Gallosterin ausgeübt wird, und ob bei Mangel an durchstrahltem Ergosterin Rachitis entsteht, um den Wert des Gallosterins als Lieferant des Vitamins A festzustellen.

1. Gruppe. Mit dem Normalfutter gefütterte Tiere. Tiernummer: 5♂, 6♀. (siehe Röntgenbild).

Die Resultate wurden im Absatz des ersten Versuches zusam-

mengestellt.

2. Gruppe. Tiere, gefüttert mit Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, zu dem 0,002 mg 5 Minuten lang durchstrahltes Ergosterin pro die und 0,4 mg Gallosterin pro die hinzugefügt war. Tiernummer: 20♂, 19♀.

Wie bei der Standartkost zeigte sich eine regelmässige Körpergewichtszunahme und in 100 Tagen wurde Nr. 19. 135 g und Nr. 20. 155 g schwer. Nach den klinischen und obduktiven Befunden wird erwiesen, dass das Normalwachstum erfolgt ist.

3. Gruppe. Tiere, gefüttert mit Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, mit Zusatz 0,002 g 5 Minuten lang durchleuchteten Ergosterins pro die und 1,6 mg Gallosterins pro die. Tiernummer: 18♂, 17♀.

Bis zum 40–50. Tage nahm das Körpergewicht ziemlich langsam zu, danach kam ein vorübergehender Stillstand der Entwicklung, vom 60–90. Tage nahm das Körpergewicht wieder zu, und am 100. Fütterungstag erreichte Nr. 17, 120 g und Nr. 18, 107 g. Ihre klinischen, obduktiven und röntgenologischen Befunde lassen keine Veränderungen erkennen. Wohl hat die in der 4 fachen Menge Gallosterin enthaltene Desoxycholsäure temporär entwickelungshemmend gewirkt.

4. Gruppe. Tiere, gefüttert mit Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, zu dem 0,4 mg Gallosterin pro die hinzugefügt war. Tiernummer: 16♂, 15♀.

Das Körpergewicht nahm 50 Tage lang regelrecht zu, danach aber stand die Entwicklung still. Von beiden Tieren war das eine unlebhaft, in der Fresslust mangelhaft, sein Penis hyperämisch und entblösst und starb 100 Tage nach Beginn der Fütterung, während das andere im Körpergewicht bald zu bald abnahm, Nasenabfluss, Tränenfluss und vermehrtes Augensekret zeigte und am 100. Fütterungstage getötet und obduziert wurde, wobei nur eine leichte Hyperämie der Pylorusgegend gefunden wurde. Das Röntgenbild zeigte beim ersten Tier das distale Ende des Oberschenkelknochens verdickt und zeigte Schatten, was mangelhafte Kalkablagerung andeutet, auch seine Länge war verkürzt, verkleinert; so zeigten sich deutlich die Symptome der Rachitis. Das

zweite Tiere liess, wenn auch in leichtem Grade, analoge Symptome erkennen. (siehe Röntgebild).

5. Gruppe. Tiere, ernährt mit Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, zu dem 1,6 mg Gallosterin pro die hinzugesetzt waren, Tiernummer: 14♂, 13♀.

Die Tiere zeigten 40–50 Tage lang langsame Körpergewichtszunahme, bald danach aber bekamen sie Nasenabfluss und wurden unlebhaft, hatten vorübergehend anhaftenes Augensekret, bekamen grob-starre Haare und starben in 50–60 Tagen. Bei der Obduktion ergaben sich Blutung aus der Magenmucosa und Lungeninfiltration. Dass die Entwicklung bei der mit dieser Kost gefütterten Gruppe schlechter war, als bei der vierten, ist wohl auf die Beeinflussung durch die Desoxycholsäure, die in der 4 fachen Menge des Gallosterins enthalten ist, zurückzuführen.

6. Gruppe. Mit Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, mit Zusatz von 0,01 cc. Vigantol pro die und 0,25 cc. Biosterin pro die ernährte Tiere, Tiernummer: 12♂, 11♀.

Bei den Tieren wurde nach der Körpergewichtszunahme, nach den klinischen und obduktiven Befunden festgestellt, dass das Normalwachstum vollendet wurde.

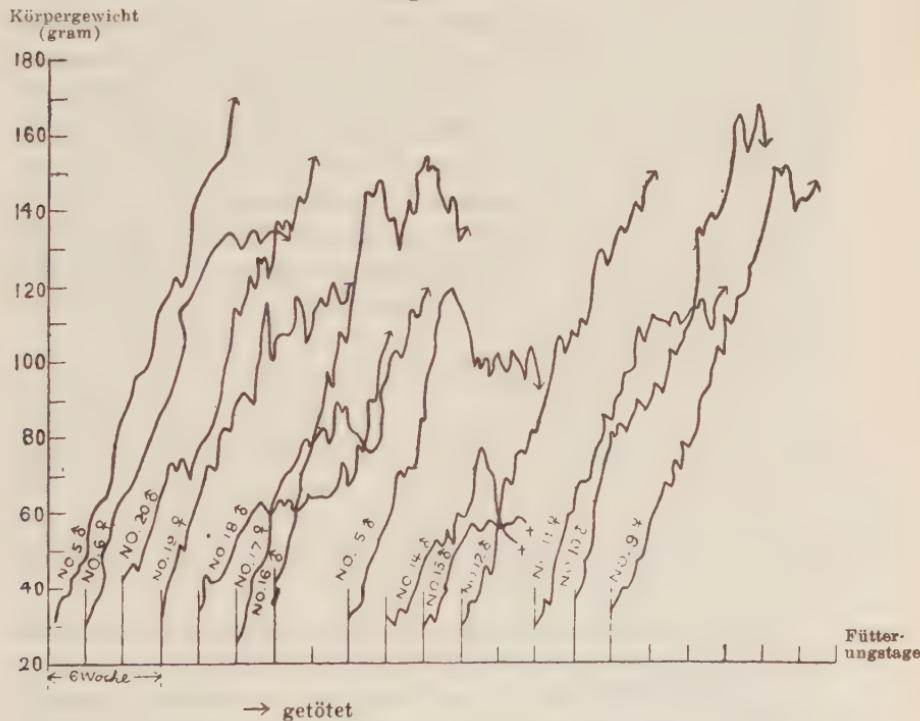
7. Gruppe. Tiere, gefüttert mit Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, zu dem 0,01 cc. Vigantol pro die und 0,4 mg Gallosterin pro die hinzugefügt waren. Tiernummer: 10♂, 9♀. Bei beiden Tieren konnte man sich davon überzeugen, dass nach regelmässiger Körpergewichtszunahme, wie auch nach klinischen und obduktiven Befunden bei ihnen das Normalwachstum wie bei der sechsten Gruppe erfolgte.

Zusammenfassend kann man sagen: Bei Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, mit Zusatz einer geeigneten Dosis 5–15 Minuten lang durchleuchteten Ergosterins erfolgt eine ziemlich regelrechte Entwicklung; wird aber dabei die Avitaminose-A erzeugt, so nehmen die Tiere alle letalen Ausgang. Bei der Fütterung mit der mit einer geeigneten oder überschüssigen Menge Gallosterin versetzten, von fettlöslichen Vitaminen freien Kost nehmen die Tiere an Körpergewicht zu, werden aber schliesslich von der Avitaminose-D befallen. Aber solehe, die mit einer

geeigneten Dosis Gallosterin ernährt wurden, bleiben länger als 100 Tage am Leben, während die mit einer überschüssigen Dosis gefütterten Tiere innerhalb 50 Tage zugrundegehen.

Fügt man zum Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, eine geeignete Dosis Gallosterin und Vigantol hinzu, so wird wie beim Versetzen dieser avitaminotischen Kost mit einer geeigneten Dosis Biosterin und Vigantol das Normalwachstum vollendet. Dass im ersten Falle aber die Wirkung vorzüglicher ist, weist darauf hin, dass das Gallosterin als Lieferant des Vitamins A in dieser Anwendungsdosis an Wirkung dem Biosterin überlegen ist.

Fig. 3.



*Experiment IV. Calcium- und Phosphormenge in den Knochen der Versuchstiere.*

Das Auftreten der Rachitis bei weissen Ratten mit Vitamin D-Mangel-Diät wurde nach dem Entwicklungszustand, dem Röntgen-

bild der Knochen und dem anatomischen Befund der Tiere festgestellte. Es ist aber ferner von grosser Wichtigkeit, den Phosphor- und Calciumgehalt der Knochen zu messen.

Die bei diesen Experimenten gebrauchte Tierdiät war wie folgt:

1) Standarddiät: Fettlösliche Vitamin-Mangel-Diät mit 5 Minuten bestrahltem Ergosterin (täglich 0,002 mg) und Gallosterin (täglich 0,4 mg) (siehe 2. Gruppe, 3. Experiment).

2) Vitamin A-Mangel-Diät: Fettlösliche Vitamin-Mangel-Diät mit überbestrahltem Ergosterin (täglich 8 mg) (siehe 7. Gruppe, 2. Experiment).

3) Vitamin D-Mangel-Diät: Fettlösliche Vitamin-Mangel-Diät mit Gallosterin (täglich 0,4 mg) (siehe 4. Gruppe, 3. Experiment).

4) Vitamin A und D-Mangel-Diät. Fettlösliche Vitamin-Mangel-Diät mit übergrosser Menge von desoxycholsaurem Natrium (täglich 1,6 mg) (siehe 5. Gruppe, 2. Experiment).

5) Kontrolle: Als Kontrolltiere gebrauchte man von der Muttermilch entwöhnte etwa 30 g schwere weisse Ratten, welche man 140 Tage lang mit Diätfütterung, der als Lieferquelle von Vitamin A und D Lebertran beigemischt wurde, aufzog. (siehe 1. Gruppe, 1. Experiment).

Nachdem man das oben beschriebene Versuchstier getötet hatte, wurde ein Oberschenkel geröntgt und der andere von Hüft- und Kniegelenk abgetrennt, die Gewebe der Weichteile entfernt, dann mit dem Soxhlet-Apparat 6 Stunden das Fett extrahiert und im Trockenapparat bei 100°C getrocknet, dann in einem Mörser pulvriert, in eine Wagschale getan und nochmals getrocknet, bis das Gewicht konstant wurde.

Als Calcium-Bestimmungsmethode wendete man die ein wenig modifizierte McCrudden'sche Methode (1911-1912) an, um auch bei kleinerer Menge den Gehalt bestimmen zu können. Nach der Veraschung löste man die Asche in Salzsäure auf, neutralisierte sie mit Ammoniak; als Indikator nahm man Methylrot, regulierte mit Essigsäure, und um PH zwischen 4,5-5,0 zu erhalten, mischte man Natriumacetat bei und sicherte dadurch die Fällung des Calciumoxalats. Um beim Umfüllen Verluste zu vermeiden, ge-

brauchte man immer das 20 cc.-Spitzglas. Zum Schluss titrierte man mit n/10 Kalium-Permanganatlösung.

Zur Phosphorbestimmung wendete man die Neumann'sche Methode (1902) an. Man fügte dem Versuchsmaterial 20 cc. Säuregemisch bei, erhitzte es langsam, mischte tropfenweise konzentrierte Salpetersäure oder Wasserstoffsuperoxyd bei. Dann liess man es verdampfen. Daraufhin kühlte man es ab und fügte 20 ccm Wasser, 40 ccm 10% Ammon-molybdat und 30 ccm 50% Ammonium nitricum zu. Nun erhielt man den Niederschlag des Phosphorammoniummolybdates, welcher etwa 30 Sekunden lang gut geschüttelt und ca. 15 Minuten lang stehen gelassen, filtriert und mit eiskaltem Wasser gewaschen wurde, bis er nicht mehr auf das Lackmuspapier reagierte. Hierauf wurde das Filtrerpapier in einen Kolben getan, kräftig geschüttelt, bis es sich möglichst in kleine Teile zersetze; dann wurde der gelbe Niederschlag unter fortwährendem Schütteln durch n/2 NaOH titriert. Man fügte 4 ccm darüber hinzu und kochte das Ganze 15 Minuten. Nachdem es gänzlich erkaltet war, gebrauchte man als Indikator Phenolphthalein und titrierte es mit n/2 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nach dem Entfärben fügte man mindestens 0,5–1 ccm Säure hinzu, kochte die Mischung, und nachdem sie wieder erkaltet war, titrierte man die überschüssige Säure mit n/2 NaOH, womit die Bestimmungsmethode vollendet war.

Die Bestimmungsergebnisse sind in den folgende Tafeln gezeigt:

1. Als man den durchschnittlichen Wert des Phosphor- und Calciumgehalts in den Knochen der Standarddiätsgruppe bestimmte, waren der Prozentsatz und P:Ca, verglichen mit der Kontrolle, die unten beschrieben ist, gleich, also P:Ca=0,73:1. Durch die kurze Ernährungszeit war das Gewicht der getrockneten Knochen und deren Phosphor- und Calciumgehalt gering, jedoch, von der Proportion P:Ca aus betrachtet, konnte man bei dieser Diät ein normales Wachstum feststellen. (Siehe 1. Tafel).

2. Bei Tieren mit Vitamin A und D-Mangel-Diät mit überschüssigem, bestrahltem Ergosterin (4 mg) war das Gewicht der getrockneten Knochen und deren Phosphor- und Calciumgehalt

## 1. TAFEL.

Gruppe mit Standardfutter (0.002 mg Ergosterin u. 0.4 mg Gallost. zugesetzt statt Vitaminen A u. D).

Tiernummer	Geschlecht	Rachitis	Lebensdauer	Gewicht des getrockneten Knochens	P	P%	Ca	Ca%	P:Ca
20	♂	—	100	0.1738	0.0245	14.1	0.0424	24.4	0.74:1
19	♀	—	100	0.1494	0.0197	13.2	0.0344	23.0	0.74:1
Mittel	♂ ♀	—	100	0.1616	0.0221	13.7	0.0384	23.7	0.74:1

verglichen mit der Kontrolle geringer. Jodoch war der Prozentsatz des Calciumgehalts 27,2%, also in Gegensatz zur Kontrolle um 4% mehr. Das Ergebnis war P:Ca=0,67:1. Es gibt Berichte von Kraitmair und Mohl (1928), die mitteilen, dass bei pathologisch-histologisch untersuchten Tieren nach Diät mit überschüssigem Ergosterin an Gefässwänden und an den inneren Organen viel Calcium lagert. Es ist interessant, dass sich bei meinen Knochenversuchen derselbe Einfluss gezeigt hat. (Siehe 2. Tafel).

## 2. TAFEL.

Gruppe mit Avitaminose-A (Vitamin A u. D fehlen, 4 mg Ergosterin zugesetzt).

Tiernummer	Geschlecht	Rachitis	Lebensdauer	Gewicht des getrockneten Knochens	P	P%	Ca	Ca%	P:Ca
26	♂	—	80	0.1360	0.0192	14.1	0.0327	27.1	0.67:1
25	♀	—	100	0.1276	0.0179	14.0	0.0348	27.3	0.66:1
Mittel	♂ ♀	—	90	0.1318	0.0186	14.1	0.0338	27.2	0.67:1

3. Bei der 3. Gruppe mit Vitamin A und D-Mangel-Diät mit 4 mg Gallosterinzusatz war das getrocknete Knochengewicht geringer, also 0,092 g; der Phosphor und Calciumgehalt war deutlich geringer. Verglichen mit der Kontrolle war der Prozentsatz des Calciumgehalts niedriger, 21.8, und P:Ca=0,85:1. (Siehe 3. Tafel).

## 3. TAFEL.

Gruppe mit Avitaminose D (V. A u. D fehlen, 4 mg Gallosterin zugesetzt).

Tiernummer	Geschlecht	Rachitis	Lebensdauer	Gewicht des getrockneten Knochens	P	P%	Ca	Ca%	P:Ca
16	♂	+	100	0.0932	0.0129	13.8	0.0211	22.6	0.79:1
15	♂	+	100	0.0898	0.0132	14.7	0.0189	21.0	0.90:1
Mittel	♂	+	100	0.0915	0.0131	14.3	0.0200	21.8	0.85:1

4. Bei der 4. Gruppe mit Vitamin A und D-Mangel-Diät und überschüssigem desoxycholsaurem Natrium war das Gewicht der getrockneten Knochen und der P:Ca-Gehalt ähnlich wie bei der Standarddiät. Wenn man nach Makimura (1929) und Kapsinow und Jackson (1924) die Tatsache bedenkt, dass in der Galle die Vitamin A und D vorhanden sind, so muss man annehmen, dass durch überschüssiges desoxycholsaures Natrium die Vitamine eingeführt wurden. (Siehe 4. Tafel).

## 4. TAFEL.

Gruppe mit Avitaminose A u. D (V. A. u. D fehlen, 1.6 mg Desoxchol-Na zugesetzt).

Tiernummer	Geschlecht	Rachitis	Lebensdauer	Gewicht des getrockneten Knochens	P	P%	Ca	Ca%	P:Ca
39	♂	-	100	0.1664	0.0236	14.2	0.0393	23.6	0.78:1
37	♀	-	100	0.1384	0.0213	15.4	0.0345	24.9	0.79:1
Mittel	♂ ♀	-	100	0.1524	0.0225	14.8	0.0369	24.3	0.79:1

5. Bei der 5. Gruppe, der Kontrollgruppe, bei der statt Vitamin A und D 3% Lebertran der Diät beigefügt wurde, war das getrocknete Knochengewicht, der Phosphor- und Calciumgehalt und der P:Ca-Wert gleich mit der Standarddiätgruppe. (Siehe 5. Tafel).

## 5. TAFEL.

Kontrollgruppe (Lebertran (3% des Futters) zugesetzt statt der Vitamin A u. D.).

Tiernummer	Geschlecht	Rachitis	Lebensdauer	Gewicht des getrockneten Knochens	P	P%	Ca	Ca%	P:Ca
49	♀	-	140	0.2424	0.0301	12.4	0.0577	23.8	0.67:1
50	♂	-	140	0.3528	0.0459	13.0	0.0797	22.6	0.74:1
6	♀	-	140	0.3460	0.0516	14.9	0.0893	25.8	0.74:1
5	♂	-	140	0.3534	0.0470	13.3	0.0792	22.4	0.77:1
3	♂	-	140	0.2940	0.0403	13.7	0.0667	22.7	0.78:1
4	♀	-	140	0.02120	0.0263	12.7	0.0505	23.8	0.67:1
Mittel	♂ ♀	-	140	0.3002	0.0241	13.6	0.0423	23.4	0.73:1

## III. ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG UND SCHLUSS.

Bei der Übersicht der obigen Versuchsergebnisse zeigt sich folgendes: Bei der Darreichung des Normalfutters mit Zusatz von Desoxycholsäure wirkt diese Säure bei Ratten auch in der überschüssigen Dosis nur etwas entwickelungshemmend, beim fettlöslichen avitaminotischen Futter tritt der Einfluss der Säure noch etwas bedeutender in die Erscheinung. Aber die Tiere starben nicht in so kurzer Zeit, wie beim Versuche von Shimizu (1929,a) an Mäusen.

Wird an Ratten das Standardfutter mit Zusatz von Ergosterin und beleuchtetem Ergosterin in der überschüssigen Dosis gegeben, so ist ein Einfluss kaum festzustellen. Aber bei der Hinzufügung zum Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, zeigten sich an Ratten verschiedene Zeichen, welche bei der Avitaminose-A auftraten. Diese Dosis steht dem von Collazo (1929) mitgeteilten Resultat nahe.

Wenn das Futter, dem fettlösliche Vitamine fehlen, mit Zusatz einer geeigneten Dosis durchstrahlten Ergosterins den Ratten gegeben wird, so entwickeln sich die Tiere eine bestimmte Zeit lang regelmässig, fallen aber schliesslich der Avitaminose-A anheim und gehen zugrunde. Ferner bei Einführung 15 Minuten lang

durchleuchteten Ergosterins setzen die Erscheinungen der Avitaminose-A früher ein, als bei 5 minutiger.

Bei den Ratten, die mit einer geeigneten Dosis von Gallosterin und bestrahltem Ergosterin ernährt werden, vollendet sich das Normalwachstum. Wird aber das Gallosterin auf die 4 fache Menge gesteigert, so wird das Wachstum einigermassen gehemmt, was wohl ein Einfluss der Desoxycholsäure ist.

Die mit dem Futter, dem fettlösliche Vitamine mangeln, mit Zusatz einer geeigneten Dosis von Biosterin 'Riken' und Vigantol gefütterte Ratte wächst wie diejenige, die mit demselben Futter mit Zusatz einer geeigneten Dosis Gallosterin und Vigantol ernährt wurde, normal. Körpergewichtszunahme am Ende des Versuches bei der letzteren Gruppe röhrt daher, dass das Gallosterin in der Wirkung dem Biosterin überlegen ist.

Wenn man das analytische Resultat der Knochen beobachtet, so zeigt sich bei weissen Ratten, die mit vollkommener Diät mit Zusatz einer mässigen Menge von Gallosterin und bestrahltem Ergosterin als Vitamin A und D gefüttert wurden, ein gutes Wachstum der Knochen, beim Nichtvorhandensein des Ergosterins als Lieferquelle des Vitamins D war das getrocknete Knochen gewicht geringer und dementsprechen war auch der Phosphor- und Calciumgehalt geringer. Der Prozentsatz war beim Calcium besonders niedrig und der Wert von P:Ca war höher.

Durch die oben erwähnten Ergebnisse soll schliesslich folgendes betont werden. Bisher wurde nach McCollum u. Simmonds (1921) angenommen, dass die Erzeugung der experimentellen Rachitis an Ratten nur beim Fehlen des Vitamin D im Futter mit Schwierigkeit, aber dann erst mit Erfolg gelingt, wenn sich damit zugeleich von den Salzen im Grundfutter die Kalzium- und Phosphormenge im nicht geeigneten Verhältnis befinden. Aber nach meinen diesmaligen Versuchen war es bei der Anwendung des Gallosterin als des Lieferanten des Vitamin A nur mit an Vitamin-D mangelnden Futter noch gut möglich, bei Ratten die Rachitis hervorzurufen.

*Anmerkung:* Das in diesem Versuche verwendete Gallosterin wurde im biochemischen Institut der medizinischen Akademie

Okayama rein dargestellt und von Prof. Shimizu, dem Vorstand des Institutes, freundlichst mir zur Verfüguung gestellt, wofür ich ihm meinen herzlichsten Dank ausspreche.

#### LITERATUR

Collazo, J. A., Rubine, P. U., Varela, B. (1929), Biochem. Z. **204**, 347.  
Fujimaki, Y. (1928), Report of the Imperial Goverment Institute for Nutrition, **2** 57.  
Hess, A. F. u. Windaus, A. (1926), Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **24**, 461.  
Kapsinow, R. und Jackson, D. (1924), Proc. Soc. experim. Biolog. Med. **21**, 472.  
Kraitmair u. Mohl (1928), Münch. med. Wochenschr. **75**, 627.  
Makimura, H. (1929), J. of Chosen med. Association. **19**, 1382.  
McCollum, E. V. and Simmonds, N. (1921), J. Biol. Chem. **47**, 507.  
McCudden, (1911), Journ. of Biolog. Chem. **10**, 187.  
Neumann, (1902), Hoppe-Seyler's Z. f. Physiolog. Chem. **37**, 113.  
Rosenheim, O. and Webster, T. A., (1927), Biochem. J., **21**, 389.  
Rosenheim, O. (1929), Biochem. J., **23**, 47.  
Saiki, T. u. Fujimaki, Y. (1928), Report of the Imperial Government Institute for Nutrition (Eiyo Kenkyusho Hokoku), **2**, 102.  
Shimizu, T. und Hatakeyama, T., (1929 a), Z. f. Physiol. Chem. **182**, 57.  
Shimizu, T. und Hatakeyama, T., (1929 b) Jikken-Iho, **16**, 45.  
Takahashi, K. Nakamiya, Z., Kawakami, K., und Kitasato, T. (1923), Bulletin of the Institute of physical and chemical research (Japan). (Rikagaku Kenkyusyo Iho), **25**, 566.



Tiere, gefüttert mit der Diät, welche von Vitamin A und D frei, welcher 0,4 mg Gallosterin als A-Vitaminquelle und vollkommene Salze zugesetzt sind, getötet am 80. Tag nach Beginn der Fütterung. Tiernummer links No. 15♀, rechts 16♂.

Mit Standarddiät ernährtes Tier, am 80. Tag nach Beginn der Fütterung getötet. Tiernummer 6♂.



## STUDIES ON THE NATURE OF THE GLASS ELECTRODE POTENTIAL. I.

By

HISATO YOSHIMURA.

(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University. Director: Prof. Dr. R. Shoji.)

(Received for publication, September 10, 1935)

### INTRODUCTION.

Since Cremer (1906) discovered the electromotive effect of a thin glass membrane, which changes according to the hydrogen ion concentration of the solution touching it, and Haber and Kremensiewicz (1909) maintained that the theoretical relation of Nernst is held between the potential of the glass electrode and the pH value of the solution, the facts have been studied further by many investigators. The writer (1935) has confirmed the fact that a glass electrode made of commercial soft glass is applicable to the pH-determination of the blood.

If the potential of a glass electrode changes from  $E_1$  to  $E_2$ , when the pH of the solution touching one side of the membrane is changed from  $pH_1$  to  $pH_2$ , while the outer side is brought into contact with one and the same solution of a certain pH, the following rectilinear relationship holds between the potential and the pH.

$$\alpha = \frac{E_1 - E_2}{pH_1 - pH_2} \dots \dots \dots (a)$$

$\alpha$  is the slope of the calibration line of the potential against the pH (the potential-pH line). The theoretical value of  $\alpha$  is  $2.303 \cdot RT/F$  ( $= 57.7$  at  $18^\circ C$ , when  $E$  is measured in m.V. units), but its empirical value is often smaller than the theoretical one, and is a constant for the electrode examined.

According to Haber's assumption, the potential should be

zero, when the pH value of the solution on both sides of the glass membrane are the same. Practically, however, there is observed a certain potential difference between them, which is called the asymmetry potential. Any definite explanation has not yet been given for these incongruities of the theory. One of the explanations established on the basis of experimental results is that of Kahler and DeEds (1931). Investigating the relation between the thickness (or the electrical resistance) of the electrode membrane and the deviations from the theory, they found that the thicker the membrane is, the greater are the deviations, and they proposed a hypothesis of the deviation film as follows. On the bared surface of the electrode above the immersion line, there is a thin film of the solution, i.e. the deviation film, of which the pH may be different from that of the solution examined. When the electrical resistance of electrode is very high, the potential of this film portion influences the electrode potential, so that  $\alpha$  of the equation ( $a$ ) becomes smaller.

As the first step of our present study, we investigated the cause of the asymmetry potential and that of the deviation of  $\alpha$  from the theoretical value, examining Kahler and DeEds' hypothesis of the deviation film, and analysing the potential of the glass electrode.

#### METHODS.

The method of the potential measurement was almost the same as previously reported (cf. Yoshimura, 1935). All experiments were carried out at 18°C, except that performed with the MacInnes glass electrode. The two saturated calomel electrodes were used to lead the potential of the glass electrode to the measuring arrangement. The potential difference between them was 1.5-2.0 m.V. The figures of the potential given in this paper are the observed data, i.e. the algebraical sums of this potential difference and the net values of the glass electrode potential in m.V. units. When the potential of the solution inside the electrode membrane is higher than that of the outside, the positive sign is attached to the figure, while the negative sign is given for the reverse case.

McIlvaine's buffer solutions were used for the material, and their pH values were determined precisely by means of the hydrogen gas electrode.

#### EXPERIMENTAL RESULTS AND DISCUSSIONS.

##### 1. Reëxamination of Kahler and DeEds' hypothesis of the deviation film.

Following Kahler and DeEds' experiments, a glass tube of 1 mm. thickness, 1 cm bore and 24 cm long, was used as the electrode, one end being sealed. The outer surface of its open end was covered for 8 cm with pure paraffin. The direct current resistance of the naked portion was  $8.6 \times 10^6 \Omega$ .

The electrode was filled with a solution of pH 2.83 to eliminate any bared surface inside the electrode. This was then immersed in solutions of a pH value of 2.83 and 7.02 respectively, leaving three different heights of the bared surface, i.e. 0, 6.0 and 11.5 cm, above the immersion line. The potential attained equilibrium in most cases within 10 minutes or so, though it often changed during the lapse of an hour or so when a bared surface was left above the immersion line. In the latter case, the potentials, measured at ca. 15 minutes after the immersion of the electrode, were compared with each other. Data are given in Table I. Assuming that a

TABLE I.

No.	Area of the bared surface	Outer solution		$\alpha$
		2.829 pH	7.023 pH	
1	0	- 5.8 m. V.	-235.5 m. V.	54.8
2	$6.0 \times 3.8 \text{ cm}^2$	-20.0	-195.0	41.7
3	$11.5 \times \text{ , ,}$	-33.0	-145.0	26.7

linear relationship was held between the pH and the potential, even when a bared surface was left,  $\alpha$  of the equation ( $\alpha$ ) was calculated from these data, and is given in the last column of the table. Here we see that, as the bared surface becomes larger, the potential of the electrode immersed in the solution of pH 2.83

decreases (has a larger minus value), while it increases when immersed in the solution of pH 7.02. Accordingly, the value of  $\alpha$  diminishes as the area of the bared surface increases. This is probably due to the formation of the deviation film on the bared surface, as Kahler and DeEds maintained. Contrary to their opinion, however,  $\alpha$  is smaller than the theoretical value of 57.7, even when no bared surface is left (cf. No. 1 in Table I). These authors stated that, if the inner surface was also coated with paraffin to the same extent as the outer surface, and both surfaces were immersed up to the same line,  $\alpha$  would take the theoretical value. Even when this suggestion was followed, however, we found that the value of No. 1 of the table did not change. If we were to explain this deviation from the theoretical value by the hypothesis of the deviation film, we must assume a deviation film under the paraffin layer.

According to our following experiment, however, such a deviation cannot be explained even by this assumption. Using the electrode described in our previous report, and immersing it in the solution of pH 2.83 or 7.02, the potentials were measured on filling it with the solutions of pH 2.83 and 7.02 respectively. From these data, the values of  $\alpha$  were calculated for the inner surface of the electrode membrane as well as for its outer surface. They are given in Table II. All these values are smaller than the theoretical, and that for the inner surface is much smaller. In this

TABLE II.

Inner solution	Outer solution	2.829 pH	7.023 pH	$\alpha$ for the outer surface
2.829 pH	—	2.0 m. V.	—236.0 m. V.	55.8
7.023	+	219.0	— 12.0	55.1
$\alpha$ for the inner surface		52.7	53.4	
Mean		53.05		55.45

experiment, the electrode was filled up with the solution, and the outer surface of the electrode tubing above the immersion line was completely coated with pure paraffin, so that no bared surface existed. Even if a deviation film could be assumed under the paraffin layer of the outer surface, which assumption is invalid according to our experiments described below, it is certain that this film does not exist at least on the inner surface of the electrode. Therefore, the fact that  $\alpha$  for the inner surface is smaller than the theoretical figure is not due to any deviation film. Moreover, the fact that the value of  $\alpha$  for the outer surface was greater than that for the inner surface, cannot be explained by the assumption of a deviation film on the outer surface, which should cause  $\alpha$  for the outer surface to be smaller. Thus the difference of  $\alpha$  for the two sides is regarded as due to the difference of the properties of the two glass surfaces.

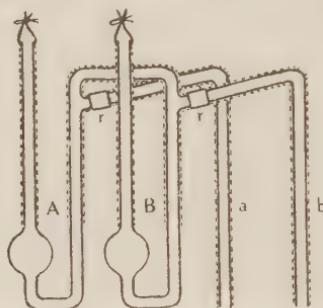
In short, Kahler and DeEds' hypothesis of the deviation film is useless to explain the deviation of  $\alpha$  from the theoretical value under usual experimental conditions, in which any bared surface of the electrode above the immersion line is eliminated by coating it with paraffin. This deviation is probably due to the nature of the glass surface with which solutions of different pH values are brought into contact.

## 2. *An analysis of the glass electrode potential.*

Imai (1933) found that every part of a collodion membrane has its own electrode potential, and the entire potential of the membrane is represented by the arithmetical mean of the potentials of all parts of it. Similar facts may be supposed in the case of the glass electrode. Kahler and DeEds maintained that the entire potential of a glass electrode is the average of the potential of the submerged part and that of the part with the deviation film, in proportion to their respective electrical conductivities. Though their suggestion lacks definite experimental proof, it suggests to us that a similar relation holds among the potentials of parts of a submerged membrane even when the deviation film is lacking.

In order to examine these suppositions, the following experi-

ments were carried out. A glass electrode was constructed by bending a glass capillary which had two bulbs blown in it somewhat apart from each other, as if two electrodes, *A* and *B*, were fused with each other (cf. Fig.). Two capillary tubes *a* and *b* were connected with the respective electrodes *A* and *B* by rubber tubing *r*,



The dotted line shows the paraffin layer  
(cf. Fig. 1 of our previous report).

to establish the liquid junction between the solution in the electrode and the leading solution (saturated KCl solution). First, the electrode *A* alone was filled with two solutions of different pH value, i.e. pH 2.79 and 6.98, in succession. Immersing it in a solution of pH 2.79, the respective potentials ( $E_A$ ) were measured, while both the inside and outside of the electrode *B* were kept empty. Next, the potentials of the electrode *B* alone ( $E_B$ ) were measured in the same manner, the electrode *A* being kept empty. According to the above mentioned supposition, the potentials of the whole electrode composed of *A* and *B* ( $E_{A+B}$ ) were calculated in the following way,

$$E_{A+B} = \frac{\frac{E_A}{R_A} + \frac{E_B}{R_B}}{\frac{1}{R_A} + \frac{1}{R_B}}$$

where  $R_A$  and  $R_B$  are the electrical resistances of the electrodes *A* and *B* respectively. These were determined by passing a direct current of 100 volts first through *A* and then through *B* (cf. MacInnes and Dole, 1930), the current being kept constant within 1% after 30 seconds or so after the initial application of the

TABLE III.

Inner solution	$E_A$	$E_B$	$E_{A+B}$ (calc.)	$E_{A+B}$ (obs.)
2.793 pH	- 97.0 m.V.	- 151.0 m.V.	- 119.2 m.V.	- 119.5 m.V.
6.982	+ 139.8	+ 88.0	+ 118.7	+ 118.5
$a$	56.5	57.1	56.8	56.8

$$R_A = 3.1 \times 10^6 \Omega; \quad R_B = 4.5 \times 10^6 \Omega$$

voltage. Then the whole electrode ( $A$  and  $B$ ) was filled successively with the same solutions and immersing it in the same solution as before, the potentials  $E_{A+B}$  were measured. It was found that the observed data coincided satisfactorily with the above calculated values (cf. Table III). Thus the potential of the whole electrode can be regarded as an average of the potentials of the two component electrodes, in proportion to their respective conductivities. The same fact was confirmed also when two electrodes were actually connected with each other by a rubber tubing, or by a KCl junction solution. It is clear that a similar relation exists with respect to the value of  $a$  (cf. the same table).

If the above mentioned relationship is true, it follows that, when the resistance of one component electrode far exceeds the other, the potential of the whole electrode approximates that of the component electrode of lower resistance, while that of the higher resistance exerts hardly any influence upon it. In order to confirm this, the following experiments were carried out.

First,  $E_A$  and  $E_B$  of an electrode of the same type as described above were measured, by applying the same inner solution (2.79 pH), while the two different solutions mentioned above were applied successively as the outer solution. Next, the inner surface of a component electrode  $A$  being coated with paraffin, and another one  $B$  alone being filled with the same inner solution, the whole electrode was immersed in the solutions of different pH values successively, and the potential  $E_{A+B}$  was measured. As is seen in Table IV,  $E_{A+B}$  coincided well with  $E_B$ , while  $E_A$  and  $E_B$  differed markedly from each other. That is, the electromotive effect of the component electrode  $A$  was completely eliminated by raising its

TABLE IV.

Outer solution	$E_A$	$E_B$	$E_{A+B}$
2.793 pH	-134.0 m. V.	- 96.0 m. V.	- 97.0 m. V.
6.982	-323.2	-301.0	-302.5
$\alpha$	45.2	48.9	49.1

resistance infinitely in practice by coating its inner surface with paraffin. This fact also indicates that there cannot be found any effect of the deviation film under the paraffin layer on the electrode tubing. It is clear that a similar fact holds with respect to the value of  $\alpha$  (cf. the same table).

Next, two single electrodes,  $A$  and  $B$ , mentioned above were prepared separately. One,  $A$ , has its bulb portion made of McInnes glass, while the other,  $B$ , is made of commercial soft glass. The direct current resistance of the MacInnes glass electrode was  $1.6 \times 10^7 \Omega$  which was about one-hundredth of that of the commercial glass electrode, namely,  $1.5 \times 10^9 \Omega$ . The potentials of these two electrodes were measured at 25°C, by applying the same outer solution of pH 7.31 throughout the experiment, and altering the pH value of the inner solution. Then the two electrodes were connected with each other by immersing their capillary bents in a junction solution of saturated KCl, and the potential of the whole electrode thus combined was measured in the same manner as above. Data are given in Table V, where  $E_B$  and  $E_A$  are the potentials of the electrode of commercial soft glass and that of MacInnes glass respectively, and  $E_{A+B}$  that of the whole electrode

TABLE V.

Inner solution	$E_B$	$E_A$	$E_{A+B}$
2.814 pH	-288.5 m. V.	-267.0	-266.7
5.462	-131.0	-110.0	-110.0
7.310	- 24.0	- 3.2	- 3.1
$\alpha$	58.6	58.4	58.4

thus combined. Although  $E_B$  was different by 21 m.V. or so from  $E_A$ , it hardly exerted any influence upon the potential of the whole electrode, and  $E_{A+B}$  coincided well with  $E_A$ .

Thus the suggestion made above, that the potential of the whole electrode is established chiefly by that of the component electrode of far lower resistance, was fully ascertained.

From the results described above, it is supposed that every part of the electrode membrane has its own potential, i.e. its own asymmetry potential and  $\alpha$ , and the entire potential measured is the average of potentials of all parts in proportion to their respective electrical conductivities. It is usually noted that, if a part of the membrane of an electrode is coated with paraffin, the electrode potential changes. The main cause of this change of the potential is probably that the electromotive effect of this part is different from that of the remaining part, and is eliminated by coating with paraffin.

So far as the glass can conduct the electricity, local currents arising from these potential differences between different parts must flow through the membrane and the solution. This is as if many cells of different voltages were connected in parallel with one another. Thus it is natural that the entire potential measured is the average of potentials of all parts in proportion to their respective electrical conductivities.

Connecting many collodion membranes with one another in parallel, Imai found that the entire potential was the arithmetical mean of the potentials of all membranes. This was probably due to the fact that the electrical resistances of the membranes were approximately equal to one another.

The fact described above has an important bearing on the practical application of the glass electrode. If we want to determine the electromotive effect of the bulb portion alone of the electrode, we must coat all other portions of the electrode with paraffin to eliminate their electromotive effects, when the resistances of the latter are not high enough to lose their own effects.

To answer the question why the potential, i.e. the value of  $\alpha$  and the asymmetry potential, is different among different parts

of the electrode membrane, we can say no more than that it is due to differences in the nature of different parts of the membrane. More detailed explanations will require further experiments.

#### CONCLUSIONS.

1. When a glass electrode of high resistance has a bared surface above the immersion line, the deviation film in Kahler and DeEds' sense is found to lessen the slope of the potential-pH line. But, under usual experimental conditions, where any bared surface is eliminated by completely coating the surface of the electrode above the immersion line with pure paraffin, we often find electrodes of which the slope of the calibration line is smaller than the theoretical one. Therefore, the main cause of this deviation of the slope is not the deviation film, but the nature of the electrode membrane, or more definitely speaking, the nature of the glass surface of the membrane on the side in question.

2. Every part of the electrode membrane has its own potential, i.e. its own potential-pH line, and the observed potential is the average of potentials of all parts of the membrane in proportion to their respective electrical conductivities.

It is a pleasure to express my thanks to the Hattori-Hokokwai for a grant defraying the expenses connected with this work.

#### REFERENCES.

Cremer (1906): Z. Biol., **47**, 562.  
Haber and Kremensiewicz (1909): Z. physik. Chem., **67**, 385.  
Imai (1933): Mitt. med. Akad. Kioto, **8**, H. 4, 833.  
Kahler and DeEds (1931): J. Amer. Chem. Soc., **53**, 2998.  
MacInnes and Dole (1930): J. Amer. Chem. Soc., **52**, 29.  
Yoshimura (1935): J. Biochem., **21**, 335.

## ON THE BUFFERING POWER OF HAEMOGLOBIN DENATURED BY HEAT.

BY

HIROSHI NAGAOKA.

(*From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto Imperial University. Director: Prof. R. Shoji.*)

(Received for publication, September 10, 1935)

### INTRODUCTION.

The buffering power of denatured proteins was first studied by Chick and Martin (1910 and 1912). They noticed that proteins underwent denaturation by heat only when water existed in the system, and also that the acid solution of haemoglobin diminished its acidity, while the alkaline solution of it decreased its alkalinity, when both were denatured by heating. Lepeschkin (1922) regarded the molecular aggregation of the denatured proteins as a chemical process rather than a purely physical one, and maintained that the aggregation was accelerated to a greater degree than the denaturation was accelerated, by the existence of a very small concentration of electrolyte. Since then there have appeared two opposite views on the nature of heat coagulation of proteins. One is to regard it as a dehydration, or chemical condensation of protein molecules taking place between amino-group of one molecule and carboxyl-group of another one. The other is to understand it as a degradation of protein molecules by mild hydrolysis. Lewis (1926) agreeing with Chick and Martin, maintained that, not only did the hydrogen- or hydroxyl-ions act as catalysts for denaturation of proteins, but free water molecules did similarly, or entered the reaction as a reactant, so that existence of water promoted denaturation. Hendrix and Wilson (1928) found that, when a solution of egg-albumin at its isoelectric point was denatured by heating at 100°C for 30 minutes, its buffering power was diminished. They assumed the heat coagulation to be

the condensation of molecules touching each other, combination taking place between free amino- and carboxyl-groups of adjacent molecules. Wu (1929) distinguished coagulation of egg-albumin definitely from its denaturation as follows: Coagulation takes place when egg-albumin is heated at its isoelectric point, or is treated with a dehydrating agent. On coagulating, protein molecules condense together on losing their free amino- and carboxyl-groups, and become scarcely soluble in an acid or alkaline solution. On the contrary, denaturation of protein molecules, which is promoted by acid or alkali, especially on being warmed, is the decomposition of the molecules to make their amino- and carboxyl-groups free from combination, and the molecules thus denatured dissolve easily in an acid or alkaline solution. Booth (1930) obtained the titration curves of a similar type for the native albumin and for the albumin heated at a high temperature ( $90-100^{\circ}\text{C}$ ) in a solution of pH 7.0, and argued against Hendrix and Wilson that the heat denaturation of protein did not involve any change in its free amino- or carboxyl-groups. Wu and his collaborators (1931 and 1934) repeated Booth's experiments and found that the coagulated albumin had a weaker buffering power than the untreated albumin, and that the pH of the former was displaced by about 0.3-0.45 pH towards the alkaline side. Prideaux and Woods (1932) reported that, in a range of pH 5.0-8.0, commercial dried albumin had a weaker buffering power than the undenatured albumin, and also that the albumin denatured by alcohol gave an almost similar titration curve to that of commercial dried albumin. Hendrix and Wharton (1934) obtained very similar titration curves for heat-coagulated and unfiltered albumin, heat-coagulated dried albumin and alcohol-coagulated albumin, and found that their buffering power were all less than that of the native albumin. And they assumed that the changes in combining power of proteins for acid and alkali were certainly of the same order, and loss of the combining power was due to either a decrease in the number of free amino- and carboxyl-groups of the protein molecules, or to a decrease in their degree of dissociation.

As mentioned above, it is generally accepted that the change

occurs in the buffer capacity of a protein solution for acid or alkali when the protein suffers denaturation or coagulation. In our previous report, it was confirmed that the heat denaturation and the coagulation of haemoglobin are quite different processes. In the present researches the change in the buffering power of haemoglobin on undergoing these two processes was studied.

#### METHODS.

*The haemoglobin solution:* In our previous research (1935), haemoglobin crystals prepared from horse blood were dissolved in an isotonic and isoelectric KCl-phosphate buffer solution ( $\text{pH } 6.71$ ) to simplify the conditions for causing heat denaturation. In the present research, however, haemoglobin was dissolved in an isotonic KCl-solution, i.e., 0.17 mol KCl-solution having a freezing point depression of  $-0.56^\circ\text{C}$ , in order to study the change in the buffering power of haemoglobin. It is then a matter of course that each solution thus prepared has a different pH value.

Haemoglobin preparation was obtained by the following procedure: Corpuscles collected from defibrinated horse blood are thoroughly washed with the KCl-solution mentioned. The corpuscular sediment is frozen and then thawed five times in succession, to bring the corpuscles into perfect haemolysis. With the KCl-solution, however, the greater part of the haemoglobin remains in a soluble state, while the rest of the haemoglobin precipitates in minute crystalline particles forming a viscous paste. This paste, which is easily resolvable, is stirred up with three its volume of the KCl-solution, and then the supernatant portion is collected by centrifuging. This is the haemoglobin solution with an isotonic salt content, which serves as the material of the present researches. As the purification of haemoglobin by this procedure is not so perfect as that carried out in the previous research, it is conceivable that more intracorporeal proteins other than haemoglobin may be included as an impurity in the present solution. Its amount, however, is very little compared with that of haemoglobin, and also the existence of these impurities will cause no disturbance to the results of the present study.

*Heating of the haemoglobin solution:* It has been already found in the previous research (the author's report, 1935) that, in order to accelerate the denaturation of haemoglobin by heating it at its isoelectric region, accompanied by least coagulation, heat is to be applied at a lower temperature 55°C for a longer duration than at a higher temperature 59°C for a shorter time. As the aim of the present researches was to study the change in the buffering power of haemoglobin accompanied by denaturation or coagulation, it was reasonable to heat the haemoglobin solution at a lower temperature for several hours, in order to make it easy to find the relations between them. Now, 40–50 cc. of the haemoglobin solution prepared as described was put into a centrifuge tube under liquid paraffin. The tube was stoppered tightly to prevent evaporation and then, in most cases, it was heated in a water bath of 52–53°C, while in certain cases higher temperatures of 80°C and 100°C were applied. After heating, the tube was taken out of the bath and cooled. Then, according to the aim of the experiment, the heated solution was centrifuged to eliminate coagulum or left unseparated. Further treatment in the experiment will be described below.

*Estimation of Fe-concentration:* For measurement of the absolute concentration of both intact and changed haemoglobin, Fe-concentration of the solution was estimated by Wong's method, which has been already described in the previous report.

*Estimation of O<sub>2</sub>-capacity:* For measurement of the extent of denaturation, we estimated the O<sub>2</sub>-capacity of the solution by means of Van Slyke's manometric apparatus; after saturating it with atmospheric air at 18°C. Oxygen which dissolved physically in water was subtracted from the observed capacity to find out the real amount of oxygen bound by haemoglobin.

*Estimation of the state of molecular aggregation of haemoglobin:* In the previous research we estimated the molecular state of haemoglobin by parallel applications of two methods, i.e., the measurement of its colloid-osmotic pressure and the Fe-concentration of the solution made free from coagula. It was seen that the two measurements gave the same results, in so far as the decrease

in the O<sub>2</sub>-capacity was not very intensive. In the present experiments, conditions were somewhat different from the previous one both as to the solvent and the temperature adopted. Then a preliminary experiment was carried out as follows:—A haemoglobin solution prepared as above was heated at 52°C for 14 hours and then centrifuged to eliminate coagula. Then both the heated solution freed from coagula and the original unheated solution were examined as to their colloid-osmotic pressure and Fe-concentration as well as O<sub>2</sub>-capacity. The following results were obtained:

	Fe-concentration	Colloid-osm. pr.	O <sub>2</sub> -capacity
Original unheated solution	3.25 mM	146 mm H <sub>2</sub> O	5.27 vol %
Original heated solution freed from coagula	1.66 mM	75 mm H <sub>2</sub> O	0.66 vol %
Relative percentage	51.0%	51.2%	12.5%

By the "relative percentage" we mean the percentage value of the figure for the heated and coagula-freed solution against the figure for the original solution. Here we see a good agreement between the relative percentages of the Fe-concentration and the colloid-osmotic pressure even when the decrease in the O<sub>2</sub>-capacity is considerable. This indicates that the coagulated haemoglobin molecules produced by heating were completely eliminated by centrifuging, none of them remaining in the supernatant solution. Therefore, the Fe-concentration alone was determined for the indication of the molecular aggregation state of haemoglobin throughout the present researches.

*Estimation of pH value:* The pH of the solution was determined by means of the usual potentiometry of the hydrogen gas electrode immersed in the solution to be examined. The electrode vessel was of the injection syringe type, used usually in our Institute (cf. Hiraki's report, 1932).

#### EXPERIMENTAL RESULTS.

*Exp. I.* A haemoglobin solution (preparation No. 1), of which the O<sub>2</sub>-capacity as well as the Fe-concentration had been

previously measured, was heated at 52.5°C for two hours. Coagula were then eliminated by centrifuging, and the O<sub>2</sub>-capacity and Fe-concentration of the remianing solution was again determined. Then both the heated and the original solutions were diluted to equate their Fe-concentrations to 2.12 milli mol, which was chosen arbitrarily throughout the whole course of this research. For convenience' sake, we will call the heated solution, made free from coagula and then diluted to equate its Fe-concentration, the "dilute heated solution", and the diluted original solution the "dilute unheated solution". Results of these measurements are given in Table Ia. The relative O<sub>2</sub>-capacity, i.e. the percentage ratio of the O<sub>2</sub>-capacity of a heated solution against that of its unheated solution, is larger for the dilute heated solution than for the original heated solution. This is due to the fact that the dilute heated solution was first made free from coagulated haemoglobin and then was diluted to equate the Fe-concentration, so that the relative content of the denatured haemoglobin in it was less than that in the original heated solution.

TABLE Ia.  
Material: Haemoglobin preparation No. 1.  
Heating: at 52.5°C for 2 hours.

	Fe-conc.	O <sub>2</sub> -capacity	
		Absolute	Relative
Original unheated solution	4.11 mM	9.47 vol %	100.0%
" heated "	3.63 "	7.89 "	83.3 "
Dilute unheated solution	2.12 "	4.90 "	100.0 "
" heated "	" "	4.61 "	94.1 "

TABLE Ib.

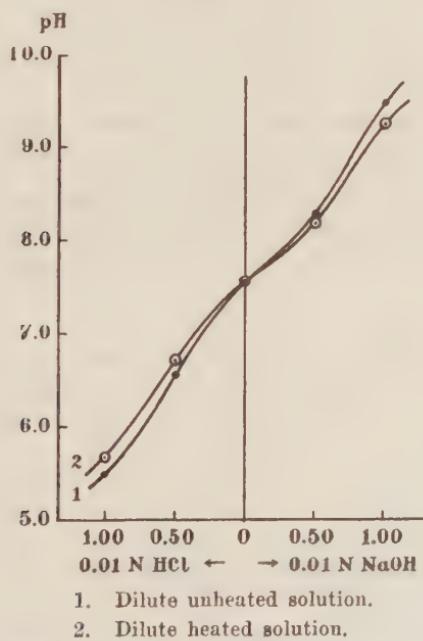
Titrated towards	Acid side		Alkaline side	
0.01 N HCl or 0.01 N NaOH added	1.00	0.50	—	0.50
pH of dilute unheated solution	5.49	6.57	7.54	8.30
pH of dilute heated solution	5.66	6.73	7.56	8.20
pH-difference	+0.17	+0.16	+0.02	-0.10
				-0.23

Now, the dilute unheated solution as well as the dilute heated solution were examined for their buffer capacity. For this purpose, a series of five titration mixtures with different amounts of 0.01*N* HCl or 0.01*N* NaOH were prepared as follows; and the

	Acid side			Alkaline side	
Solution	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
0.01 <i>N</i> HCl	1.00	0.50	—	—	—
0.01 <i>N</i> NaOH	—	—	—	0.50	1.00
H <sub>2</sub> O	1.00	1.50	2.00	1.50	1.00

pH of each mixture was measured. For the sake of simplicity, we will signify each mixture hereafter only by the amount of the HCl- or NaOH-solution added. Results of these measurements are given in Table Ib (cf. Fig. 1).

Fig. 1.



The pH-difference means the difference between the pH values

of the dilute unheated and the dilute heated solutions when each is mixed with the same amount of acid or alkali. The positive sign means that the heated solution has a higher pH than the corresponding unheated one, while the negative sign means just the reverse. As the pH-difference of the two solutions without addition of acid or alkali is much less than that when mixed with acid or alkali, both the positive pH-difference on the acid side and the negative pH-difference on the alkaline side indicate that the heated solution has a larger buffer capacity than the unheated one.

*Exp. II.* An experiment similar to that of Exp. I was repeated with the same haemoglobin solution (preparation No. 1), on heating it at 52.5°C for four hours. Results are given in Table IIa and IIb, and also in Fig. 2. The same results were observed, in this case; i.e. that the heat denaturation of haemoglobin accompanies an augmentation of its buffering power both for acid and for alkali.

TABLE IIa.

Material: Haemoglobin preparation No. 2.

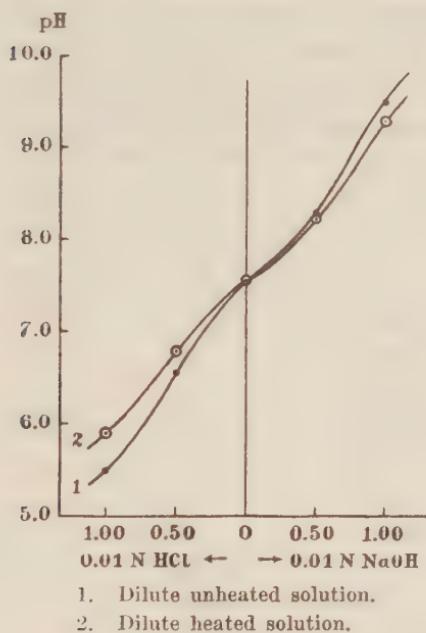
Heating: at 52.5°C for 4 hours.

	Fe-conc.	O <sub>2</sub> -capacity	
		Absolute	Relative
Original unheated solution	4.11 mM	9.47 vol %	100.0%
" heated "	3.46 "	5.76 "	60.8 "
Dilute unheated solution	2.12 "	4.90 "	100.0%
" heated "	" "	3.53 "	72.0 "

TABLE IIb.

Titrated towards	Acid side			Alkaline side	
0.01 N HCl or 0.01 N NaOH added	1.00	0.50	—	0.50	1.00
pH of dilute unheated solution	5.49	6.57	7.54	8.30	9.51
pH of dilute heated solution	5.90	6.79	7.56	8.25	9.30
pH-difference	+0.41	+0.22	+0.02	-0.05	-0.21

Fig. 2.



1. Dilute unheated solution.  
2. Dilute heated solution.

*Exp. III.* Again another experiment was carried out in the same way with another haemoglobin solution (preparation No. 2). Heat was applied at 52.0°C for three hours. The above mentioned effect was again confirmed. Results are to be seen in Table IIIa and IIIb, and also in Fig. 3.

TABLE IIIa.

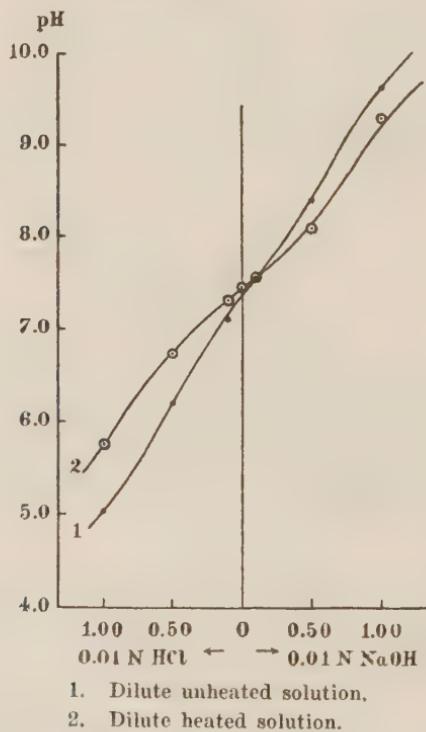
Material: Haemoglobin preparation No. 2.  
Heating: at 52.0°C for 3 hours.

	Fe-conc.	O <sub>2</sub> -capacity	
		Absolute	Relative
Original unheated solution	3.25 Mm	5.33 vol %	100.0%
„ heated „	2.12 „	1.54 „	28.9 „
Dilute unheated solution	„ „	3.48 „	100.0 „
„ heated „	„ „	1.54 „	44.3 „

TABLE IIIb.

Titrated towards	Acid side			Alkaline side	
0.01 N HCl or 0.01 N NaOH added	1.00	0.50	—	0.50	1.00
pH of dilute unheated solution	5.04	6.19	7.42	8.28	9.61
pH of dilute heated solution	5.76	6.74	7.45	8.09	9.28
pH-difference	+0.72	+0.55	+0.03	-0.19	-0.33

Fig. 3.



1. Dilute unheated solution,

2. Dilute heated solution.

*Exp. IV.* In this experiment, the procedure was somewhat modified. A haemoglobin solution (preparation No. 3) was heated at 52.7°C for two hours. The heated solution was divided into two portions. One portion, A, was centrifuged to make it free from coagula as before, while the other, B, was left unseparated.

Now these two portions, together with the original unheated solution, were diluted, each to bring the Fe-concentration to the same value, namely 2.12 mM. We will distinguish the diluted sample prepared from the heated portion B by the "dilute heated solution including coagula." Their Fe-concentration as well as O<sub>2</sub>-capacity are given in Table IVa. In this table we see that the original

TABLE IVa.

Material: Haemoglobin preparation No. 3.  
Heating: at 52.7°C for 2 hours.

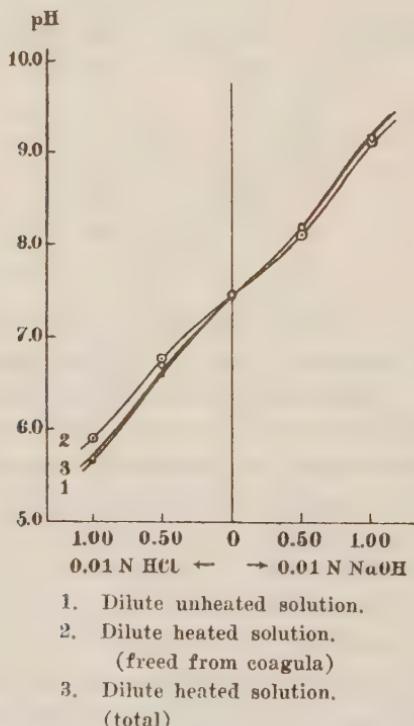
	Fe-conc.	O <sub>2</sub> -capacity	
		Absolute	Relative
Original unheated solution	4.11 mM	9.47 vol %	100.0%
" heated "	3.52 "	6.80 "	71.8,,
" heated " (including coagula)	4.11 "	7.07 "	74.7,,
Dilute unheated solution	2.12 "	4.90 "	100.0,,
" heated "	" "	4.10 "	83.7,,
" heated " (including coagula)	" "	3.66 "	74.7,,

heated solution, from which the coagula were eliminated, had a smaller relative O<sub>2</sub>-capacity than the original heated solution including coagula. This suggests to us that a small portion of the active haemoglobin which was adsorbed by the coagulated one, was eliminated by centrifuging, the coagulated haemoglobin certainly having no ability to combine with oxygen. Then, each of these diluted solutions were examined as to its buffer capacity. Results are summarized in Table IVb (cf. Fig. 4). The pH-difference of the dilute heated solutions excluding or including coagula means naturally the difference between the pH value of the unheated and heated solutions. By this experiment, too, the above mentioned effect was confirmed. The pH-differences existing between the titrated mixtures prepared with dilute heated solution including coagula have the same sign as those of the dilute heated solution freed from coagula, but, the magnitude of them is not far from

TABLE IVb.

Titrated towards	Acid side		—	Alkaline side	
0.01 N HC for 0.01 N NaOH added	1.00	0.50	—	0.50	1.00
pH of dilute unheated solution	5.66	6.59	7.44	8.20	9.16
pH of dilute heated solution	5.90	6.75	7.46	8.11	9.11
pH-difference	+0.24	+0.16	+0.02	-0.09	-0.05
pH of dilute heated solution (including coagula)	5.68	6.69	7.46	8.19	9.15
pH-difference	+0.02	+0.10	+0.02	-0.01	-0.01

Fig. 4.



that of the sample without addition of acid or alkali. This fact will be discussed later in reference to further experiments below.

*Exp. V.* An experiment similar to Exp. IV was performed with another haemoglobin solution (preparation No. 4). Heat was applied at 52.5°C for nineteen hours. In this experiment, the O<sub>2</sub>-capacity of the solution after being heated was markedly diminished, and a larger amount of coagulum was performed. Then the original solution, the heated solution including coagula, and also the heated solution freed from coagula were diluted to equate their Fe-concentration to 2.12 mM as before. The coagula were also suspended in the KCl-solution in such a proportion as to have the same Fe-concentration. It was confirmed that this suspension had no O<sub>2</sub>-capacity except the amount physically dissolved in it. Results are given in Table Va. All these diluted samples were examined for their buffer capacity. See Table Vb. Results are the same as those of Exp. 4. The coagula have almost the same buffering power as the unheated haemoglobin on the acid side, but a weaker power than the latter on the alkaline side. This suspension was heated again at 100°C for 20 minutes and then its buffer capacity was determined, the result being given also in Table Vb.

TABLE Va.

Material: Haemoglobin preparatoion No. 4.

Heating: at 52.5°C for 19 hours.

	Fe-conc.	O <sub>2</sub> -capacity	
		Absolute	Relative
Original unheated solution	3.37 mM	8.11 vol %	100.0%
" heated "	2.92 "	1.43 "	17.6 "
" heated " (including coagula)	3.31 "	1.06 "	13.1 "
Dilute unheated solution	2.12 "	5.10 "	100.0 "
" heated "	" "	1.04 "	20.4 "
" heated " (including coagula)	" "	0.68 "	13.3 "
Suspension of coagula	" "	--	--

TABLE Vb.

Titrated towards	Acid side			Alkaline side	
0.01 <i>N</i> HCl or 0.01 <i>N</i> NaOH added	1.00	0.50	—	0.50	1.00
pH of dilute unheated solution	5.78	6.68	7.45	8.07	8.98
pH of dilute heated solution (freed from coagula)	6.12	6.83	7.44	8.02	8.72
pH-difference	+0.34	+0.15	-0.01	-0.05	-0.26
pH of dilute heated solution (including coagula)	6.08	6.80	7.45	8.06	8.90
pH-difference	+0.30	+0.12	0.00	-0.01	-0.08
pH of suspension of coagula	5.73	6.63	7.40	8.14	9.06
pH-difference	-0.05	-0.05	-0.05	+0.07	+0.08
pH of suspension of coagula, the above mentioned suspen- sion heated again at 100°C for 20 min.	5.58	6.41	7.48	8.62	9.53
pH-difference	-0.20	-0.27	+0.03	+0.55	+0.55

*Exp. VI.* This experiment was carried out to elucidate mainly the buffering power of coagulated haemoglobin. A haemoglobin solution (preparation No. 5) was separated in three portions, A, B and C respectively. The portion A was heated at 52.3°C for 19 hours; the portion B at 79.5°C for 20 minutes; and the portion C at 100°C for 20 minutes. The portion A had still a considerable O<sub>2</sub>-capacity after being heated, so that it was centrifuged and the supernatant solution was separated from coagula and diluted to have the above mentioned Fe-concentration. The other two preparations had no more O<sub>2</sub>-capacity after being heated. Then the coagula of A, B and C respectively, after each had been washed three times with the KCl-solution, were suspended in the same KCl-solution in a certain proportion to have the same Fe-concentration mentioned above. Of these suspensions, as well as the diluted heated solution of A portion, the buffer capacity was estimated as usual. See Table VIa and VIb. As to the buffering power of these coagula, details will be given in the discussion below.

TABLE VIA.

Material: Three portions, A, B and C of the haemoglobin preparation No. 5.

Heating: Portion A, at 52.3°C for 19 hours.

B, at 79.5°C for 20 minutes.

C, at 100°C for 20 minutes.

	Fe-conc.	O <sub>2</sub> -capacity	
		Absolute	Relative
Dilute unheated solution	2.12 mM	5.95 vol %	100.0%
„ heated „	„	1.17 „	19.7 „
Dilute suspension of coagula A	„	0.29 „	4.9 „
„ B	„	0	—
„ C	„	0	—

TABLE VIB.

Titrated towards	Acid side			—	Alkaline side		
	0.01N HCl or 0.01N NaOH added	2.00	1.00		0.50	1.00	2.00
pH of dilute unheated solution	4.44	5.88	6.73	7.28	—	8.62	9.81
pH of dilute heated solution	4.40	5.90	6.77	7.46	—	8.82	9.94
pH-difference	-0.04	+0.02	+0.04	+0.18	—	+0.20	+0.13
pH of suspension of coagula A	5.12	5.94	6.60	7.05	—	8.64	9.79
„ B	4.95	5.93	6.57	7.37	—	9.17	10.05
„ C	4.88	5.92	6.40	7.57	—	9.23	10.07

## DISCUSSION.

1. *The buffering power of different preparations of haemoglobin:* The buffering power of different preparations should naturally be compared on the basis of their equi-concentrated solutions with regard to their Fe-content. The magnitude of the buffering power is indicated by a shift of the pH value of such a solution, caused by the addition of acid or alkali. For an example, we will cite the results of Table Ib, and compute the pH-shifts as follows:

Titrated towards	Acid side		Original	Alkaline side	
HCl or NaOH added	1.00	0.50	—	0.50	1.00
pH	5.49	6.57	7.54	8.30	9.51
pH-shift	-2.05	-0.97	—	+0.76	+1.97

The negative sign of the pH-shift means a decrease in pH value, while the positive sign denotes its increase. Similar computations are carried out for all five preparations examined. Results are arranged in Table VII in the order of their O<sub>2</sub>-capacity.

TABLE VII.  
pH-shifts of dilute unheated haemoglobin preparations.

Exp.	Hb-prep.	Fe-conc. (mM)	O <sub>2</sub> - capacity (vol. %)	pH	Acid side 0.01 N HCl		Alkaline side 0.01 N NaOH	0.50	1.00
					1.00	0.50			
III	No. 2	2.12	3.48	7.42	2.38	1.23	—	0.86	2.19
I	" 1	"	4.90	7.54	2.05	0.97	—	0.76	1.97
IV	" 3	"	4.90	7.44	1.78	0.85	—	0.76	1.72
V	" 4	"	5.10	7.45	1.67	0.77	—	0.62	1.53
VI	" 5	"	5.95	7.28	1.40	0.55	—	—	1.34

Here we see that the shift of pH value caused by addition of the same amount of acid or alkali is larger, i.e., its buffer capacity is less, when its O<sub>2</sub>-capacity is smaller. That is, the different haemoglobin samples prepared from the blood of the same horse by the same procedure have different buffering power. Among equi-concentrated solutions with regard to Fe, the one which has a poorer O<sub>2</sub>-capacity, i.e., which contains more denatured haemoglobin, has a weaker buffering power for acid as well as for alkali. This means that the denaturation of haemoglobin taking place during the process of its preparation causes a diminution in its buffering power.

2. *The buffering power of haemoglobin denatured by heating at its isoelectric region:* In each of the Exps. I-V (cf. Tables I-V), we see that the denatured haemoglobin solution produced by heat-

ing at its isoelectric region, has a larger buffer capacity than that of its original solution in equal Fe-concentration. In other words, haemoglobin, when heated at its isoelectric region, increases its buffering power concurrently with its increase in denaturation before causing its molecular aggregation. In Exp. VI (cf. Table VI), however, the buffering power of haemoglobin decreases, while its denaturation proceeds further than when treated as in Exps. I-V. Explanation of this fact will be given later. Wu and his collaborators maintained that the protein is generally decreased in its buffering power on heating at its isoelectric region accompanied by coagulation, while on addition of acid or alkali, its buffering power is increased concurrently with its denaturation. In the present experiments, however, it is evident that the buffering power of haemoglobin was augmented by heating at a lower temperature in a solution at its isoelectric region, accompanied by its denaturation, before its molecular aggregation, i.e. coagulation, took place. The buffering power of the coagulated haemoglobin will be discussed later. Following the above mentioned fact, that the denaturation of haemoglobin caused by heating increases its buffering power, while it is decreased by purification, it is conceivable that both types of denaturations differ essentially from each other, so far as their acid- or base-combining ability is concerned. Accordingly, the extent of denaturation of oxyhaemoglobin is represented more reasonably by the decrease in its O<sub>2</sub>-combining ability than by the increase in its buffering power.

In order to study the relations between the extent of denaturation of heated haemoglobin solution and its decrease in buffer capacity, results of Exps. I-VI (cf. Tables I-VI), which are concerned to the pH-differences between the denatured and undenatured solution produced by addition of acid or alkali in definite amounts, are arranged in Table VIII, in the order of their relative O<sub>2</sub>-capacity. As shown in this table, the pH-differences between the denatured and undenatured haemoglobin solutions increase parallel with their decrease in O<sub>2</sub>-capacity, i.e., with the progress of their denaturation on the acid side, so far as the decrease in the O<sub>2</sub>-capacity is not very intensive. This means a parallel pro-

TABLE VIII.

Comparison of the relative O<sub>2</sub>-capacities of denatured haemoglobin solutions with the pH-differences between them.

Exp.	Hb-prep.	Heating	Fe-conc. (mM)	Relative O <sub>2</sub> - capacity (%)	Acid side 0.01 N HCl		Alkaline side 0.01 N NaOH	
					1.00	0.50	—	0.50
I	No. 1	52.5°C for 2 h.	2.12	94.1	+0.17	+0.16	+0.02	-0.10
IV	" 3	52.7°C " 2 "	"	83.7	+0.24	+0.16	+0.02	-0.09
II	" 1	52.5°C " 4 "	"	72.0	+0.41	+0.22	+0.02	-0.05
III	" 2	52.0°C " 3 "	"	44.3	+0.72	+0.55	+0.03	-0.19
V	" 4	52.5°C " 19 "	"	20.4	+0.34	+0.15	-0.01	-0.05
VI	" 5	52.3°C " 19 "	"	19.7	+0.04	+0.04	+0.18	-0.20
								+0.13

gression of the two processes of the haemoglobin solution on being heated, i.e., the progress of denaturation, and the increase in its buffer capacity. These facts agree with the opinion of Hendrix and Wilson as well as that of Wu, who maintained that the denaturation of protein is one of degradation, i.e. the decomposition products of the molecules, freeing their amino- and carboxyl-groups from combination. On the alkaline side, however, the relations between these two processes is more irregular than on the acid side, so that it can not be explained so simply. When the haemoglobin is denatured so strongly by heating that its relative O<sub>2</sub>-capacity becomes lower than 20%, the acceleration of its buffer capacity, once augmented by milder heating, begins to shift in the opposite direction. So that the buffering power of highly denatured haemoglobin becomes below that of the original unheated sample. An example of this is seen in Exp. VI. Thus, we come to the conclusion that when the haemoglobin solution is heated at about 52°C, its buffer capacity increases to a certain extent parallel with the decrease in its O<sub>2</sub>-capacity, but when the decrease in its relative O<sub>2</sub>-capacity becomes lower than 20%, the change in its buffer capacity begins to shift in the opposite direction, despite the ceaseless decrease in the O<sub>2</sub>-capacity. This change in buffer capacity is concerned with the action of some processes other than coagulation on the highly denatured haemoglobin.

3. *O<sub>2</sub>-binding ability of denatured haemoglobin by heating:*

In Exps. I-VI (cf. Table VIII) the temperature applied was always within the scope of 52.0°C–52.7°C. It had been already found in the previous research (the author's report, 1935) that the O<sub>2</sub>-capacity of the same haemoglobin preparation decreases in parallel with duration of heating, when the applied temperature was constant. On the different haemoglobin preparation as in the present researches, however, the decrease in their O<sub>2</sub>-capacity is not always proportional with duration of heating. For example, the O<sub>2</sub>-capacity of the haemoglobin solution (preparation No. 1), which was heated at 52.5°C for four hours, is smaller than that of the haemoglobin solution (preparation No. 2), which was heated at 52.0°C for three hours. This inconsistency is due to the fact that the resistance of haemoglobin against heat, which is different in these two preparations, plays an important rôle on its heat denaturation.

4. *Change of pH value of the haemoglobin solution on heating:* The pH-differences between denatured haemoglobin solutions and their original unheated solution in equal Fe-concentration, observed in Exps. I-VI, are summarized in Table IX. Here we see that each of the pH values of the original unheated solution is larger by about 0.02 pH than that of the corresponding heated solution, when it is heated at about 52°C for two to four hours.

TABLE IX.

pH-differences between denatured and undenatured haemoglobin solution.

Exp.	Hb-prep.	Heating	Dilute heated haemoglobin solution	pH-difference
I	No. 1	52.5°C for 2 h.	freed from coagula	+0.02
II	" 1	52.5°C " 4 "	"	+0.02
III	" 2	52.0°C " 3 "	"	+0.03
IV	" 3	52.7°C " 2 "	{ " total	+0.02 +0.02
V	" 4	52.5°C " 19 "	{ freed from coagula total	-0.01 0.00
VI	" 5	52.3°C " 19 "	freed from coagula	+0.18

Wu and his collaborators observed that the pH of an egg-albumin solution, of which the original pH was 7.0, shifted, on being heated at 90–95°C for 30 minutes, towards the alkaline side by about 0.3–0.45 pH, while its buffer capacity decreased to a certain extent. In the present experiments, however, the pH of the heated haemoglobin solutions shifted only about 0.02 pH towards the alkaline side, the temperatures applied being far lower than those in Wu's experiments. In those cases, when the heating was carried out for a longer duration, i.e. for nineteen hours, these differences are not fixed, and shifted either towards the acid or the alkaline side.

5. *The buffering power of the coagulated haemoglobin and its relation to heating:* In order to study the relations between the buffer capacity of a heated haemoglobin solution including coagula and that of the same heated solution freed from coagula in an equal Fe-concentration, the pH-differences between these heated solutions and their original unheated solutions on addition of acid or alkali are cited from Tables IV and V, the heated solutions freed Table X. In both Exps. IV and V, the heated solutions freed from coagula, i.e., the solutions including only undenatured and denatured haemoglobin, have a larger buffer capacity than that of the same haemoglobin solutions not centrifuged, i.e. the solutions

TABLE X.  
pH-differences between denatured, coagulated or mixedtures samples  
and their original unheated solutions.

Exp.	Hb-prep.	Heating	Equi-concentrated sample (Fe 2.12 mM)	Acid side 0.01 N HCl		Alkaline side 0.01 N NaOH		
				1.00	0.50	—	0.50	1.00
IV	No. 3	52.7°C 2 h.	Heated solution (freed from coagula)	+0.24	+0.16	+0.02	-0.09	-0.05
			Heated solution (total)	+0.02	+0.10	+0.02	-0.01	-0.01
V	No. 4	52.5°C 19 h.	Heated solution (freed from coagula)	+0.34	+0.15	+0.01	-0.05	-0.26
			Heated solution (total)	+0.30	+0.12	0.00	-0.01	-0.08
			Suspension of coagula	-0.05	-0.05	-0.05	+0.07	+0.08

including undenatured, denatured and also coagulated haemoglobin when their Fe-concentrations are equated. This indicates that the soluble denatured haemoglobin produced by heating, has a larger buffering power than the coagulated haemoglobin. In Exp. V; we see furthermore that the buffering power of the coagulated haemoglobin, which was suspended in the KCl-solution in an equal Fe-concentration, is smaller, especially on the alkaline side, than that of the original unheated sample. In Exp. VI (cf. Tables VIa and VIb), three suspensions of coagulated haemoglobins, A, B and C respectively, and also the original unheated solution were examined on their buffer capacities. The coagulated haemoglobins, A, B and C were prepared from the same haemoglobin solution, by heating it at 52.3°C for 19 hours, 79.5°C for 20 minutes and 100°C for 20 minutes respectively. It was found that the pH value of these suspensions as well as of the original solution are not so close to each other as those of the solutions in Exps. I-V, so that the corresponding shifts of pH of these suspensions caused by adding the same amount of acid or alkali are taken, instead of their pH-differences, as a means to compare their buffering power. Data are given in Table X. As shown in this table, the pH-shifts of the two suspensions B and C, which were heated at a higher temperature for a shorter duration, are larger on the acid side, than those of their original unheated solutions, while the pH-shift of the suspension A, which was heated at a lower temperature for a longer duration, is smaller on the acid side than that of its original solution. In other words, the former two suspensions B and C, which were heated at a higher temperature, decrease in their buffer capacities on the acid side, while the latter which was heated at a lower temperature is just the reverse. The latter suspension A, however, has still an exceptional oxygen-combining ability in 4.8% of its original power, so that it is reasonable to suppose that this increase in buffer capacity of the latter is due to the adhesion of undenatured haemoglobin molecules to the coagula, despite the three times washing with the KCl-solution after heating. Thus, we come to a conclusion that the coagulated haemoglobin produced by heating at its isoelectric region decreases generally in its buffer-

ing power. In Exp. V, the suspension of coagula, which were separated from the haemoglobin preparation (No. 4) after being heated at 52.5°C for 19 hours, was again heated at 100°C for 20 minutes, and then its buffer capacity as well as that of the unheated suspension were determined (cf. Table V). Then, it was observed that the buffer capacity of the heated suspension was smaller than that of the unheated one for acid as well as for alkali, both suspensions having no O<sub>2</sub>-capacity. Thus, the suspension of coagulated haemoglobin, which was produced by heating at a lower temperature, diminishes its buffer capacity, on being heated again at a higher temperature. In the Table XI, we observe a similar effect, that the suspensions of the coagulated haemoglobin, A, B and C decrease in their buffer capacity on the acid side in the order of their intensity of heating. After all, the buffering power of the coagulated haemoglobins produced by heating at different temperatures is not always the same, and is smaller generally in the order of their intensity of heating.

TABLE XI.  
pH-shifts of three suspensions of coagula produced by heating the haemoglobin preparation (No. 5) at different temperatures.

Equi-concentrated sample with regard to Fe. (2.12 mM)	Heating	Acid side 0.01 N HCl			Alkaline side 0.01 N NaOH		
		2.00	1.00	0.50	0.50	1.00	2.00
pH-shift of unheated solution	not heated	-2.84	-1.40	-0.55	—	+1.34	+2.53
pH-shift of suspension of coagula A	52.3°C 19h.	-2.93	-1.11	-0.45	—	+1.59	+2.74
"	B 79.5°C 20m.	-2.42	-1.44	-0.80	—	+1.80	+2.68
"	C 100°C 20m.	-2.69	-1.65	-1.17	—	+1.66	+2.50

#### SUMMARY.

1. Haemoglobin, dissolved in an isotonic KCl-solution, was heated to various extent at its isoelectric region, and the buffering power of the denatured as well as of the coagulated haemoglobin was studied.

2. Haemoglobin, when heated at its isoelectric region, dena-

tures first in a soluble state before its molecular aggregation, i.e. coagulation takes place, and its buffering power increases parallel to its denaturation to a certain extent. When the haemoglobin is denatured more intensively by heating, however, its buffering power begins to shift in the opposite direction despite the ceaseless decrease in its O<sub>2</sub>-capacity. Accordingly, the extent of denaturation of haemoglobin is represented more reasonably by the decrease in its O<sub>2</sub>-combining ability than by the increase in its buffering power.

3. When a haemoglobin solution is heated at about 52°C for several hours at its isoelectric region, its pH value shifts only about 0.02 pH towards the alkaline side.

4. Coagulation of haemoglobin, produced by heating at its isoelectric region, decreases in its buffering power, which decrease proceeds further in proportion to their intensity of heating.

5. Denaturation of haemoglobin, taking place during the process of its preparation causes a diminution in its buffering power.

#### REFERENCES.

Booth (1930): Biochem. J., **24**, 158.  
Chick and Martin (1910): J. of Physiol., **40**, 404; (1912), see also  
ditto, **45**, 261.  
Chou and Wu (1934): Chinese J. of Physiol., **8**, 145.  
Hendrix and Wharton (1934): J. of Biol. Chem., **105**, 638.  
Hendrix and Wilson (1928): J. of Biol. Chem., **79**, 389.  
Hiraki (1932): J. of Biochem., **15**, 345.  
Lepeschkin (1922): Biochem. J., **16**, 678.  
Lewis (1926): Biochem. J., **20**, 964.  
Nagaoka (1935): J. of Biochem., **21**, 355.  
Peters and Van Slyke (1932): Quantitative Clinical Chemistry,  
Methods, 670, Baltimore.  
Prideaux and Woods (1932): Proc. Roy. Soc. London, Series B, **110**,  
353.  
Wu (1929): Chinese J. of Physiol., **3**, 1.  
Wu, Liu and Chou (1931): Chinese J. of Physiol., **5**, 309.



## SPECTROSCOPIC STUDIES ON PURIFIED ENZYMES.

### II Report. On Amylase and Peroxidase.

By

RYOJI ITOH.

(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,  
Fukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)

(Received for publication, September 28, 1935)

Starting from the same object described in the previous communication (Itoh, 1935) the author extended the investigation to amylase and peroxidase, the results of which are reported in this paper.

### EXPERIMENTS.

#### I. Amylase.

Watery extract from rice-malt was dialyzed in refrigerator, treated with alumina gel ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) in  $M/5$  acetate buffer solutions at pH 4, and then the enzyme adsorbed was eluted by the use of  $M/150$  phosphate buffer solution of pH 7.

The eluate was submitted again for dialysis in refrigerator.

The amylase activity of this eluate was measured by the method of Willstätter, Waldschmidt-Leitz and Hesse (1923) and expressed by the amylase value, which is defined by them as the number of amylase unit in 0.01 g of dry preparations. The conditions for measuring the activity of the enzyme were kept constant in all the experiments. These were 10 minutes hydrolysis at  $37^\circ$  of 0.25 g starch solution at pH 5.1 in a total volume of 37 cc. The maltose which formed by the hydrolysis of starch was measured by the method of Willstätter and Sehadel (1918). The enzyme preparation obtained above showed amylase value 0.76. This clear enzyme solution showed the positive Molisch test and contained

approximately 4-5 per cent of nitrogen, giving the usual protein color reaction as well as the typical selective absorption band of protein with a maximum at  $272 \text{ m}\mu$  as shown in Fig. 1(a).

Further purifications were carried out by repeating adsorption with alumina gel, followed by elution and dialysis.

The activity of this purified enzyme solution increased about five times, showing the amylase value 3.7. The nitrogen content in this solution was reduced to 1.4%, and the protein colour reactions of biuret, xanthoproteic, Millon, and ninhydrin were all negative and no precipitate was obtained with phosphotungstic acid, silver nitrate, picric acid, or even, by heating. But the Molisch reaction for carbohydrate still came out as intensely as observed at the first adsorption. The specific absorption band of protein with a maximum at  $272 \text{ m}\mu$  in the enzyme solution of the first absorption (4-5% N content) became highly indistinct after the second adsorption in accord with its concentration (1.4% N) as shown in Fig. 1(b).

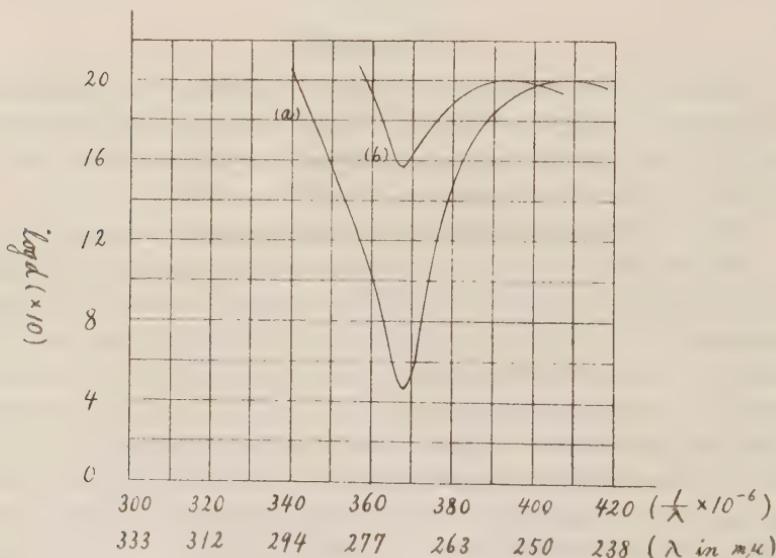


Fig. 1. Absorption curve of amylase.

(a) crude preparation.

(b) purified preparation.

*Discussion.*

Shermann and his co-workers (1915, 1926, 1930, 1934) working with pancreatic amylase and Luers and Sellner (1925) working with malt amylase obtained an enzyme preparation which showed a typical protein reaction but negative of the Molisch reaction, and they concluded that the amylase would be protein in nature. To the contrary, Willstätter and Waldschmidt-Leitz (1923, 1924, 1932) working with pancreatic amylase obtained an amylase preparation which showed neither protein nor Molisch reaction, and they concluded that the amylase would be non-protein in nature.

Recently Ficke and Kaja (1924) working with malt amylase and Giri (1934) working with the amylase in batata obtained a preparation which showed no protein reaction but positive in the Molisch reaction, and they concluded that the amylase would be non-protein but carbohydrate in nature. Toward such a conclusion, this spectroscopic examination gave an additional evidence. Though the enzyme preparation obtained by the author from rice malt contains still a trace of protein even at the final stage of purification yet the fact that the diminution of protein content rather caused the increase of enzymic activity stands in favour of the conclusion that amylase may have little concern with protein in nature. On the other hand the reaction of carbohydrate remained undiminished throughout all stages of purification, even showing the tendency to increase as the purification proceeds. We may be justified, therefore, to conclude that the chemical nature of amylase is carbohydrate.

*II. Peroxidase.*

The peroxidase was prepared according to the method described by Willstätter and Stoll (1918). The Eutrema wasabi (a sort of horseradish) was used as the source of the enzyme. Roots of wasabi were cleaned, cut into slices about 1 mm. thick and soaked in running water for 6 days. The slice gradually darkened and in the confirmation of Willstätter's statement, those which

developed a deep brown color gave the best yield of the enzyme. The slices were freed from water, treated with 4% oxalic acid, and minced into paste from which the enzyme was extracted with barium hydroxide. The enzyme solution was freed from barium by passing carbon dioxide into the solution, and a large amount of protein was precipitated by the addition of nine-tenth volumes of absolute alcohol. Excess of alcohol is strictly avoided as peroxidase will be precipitated. The clear filtrate was rapidly evaporated under pressure to a small volume, at a temperature below 35°. The residual yellow liquid, after removal of barium carbonate by filtration, was treated at 10° with 5 volumes of absolute alcohol, resulting in precipitation of the easily filtrable enzyme.

This raw preparation was further purified by the adsorption method described by Willstätter and Pollinger (1923). The filtrate was dissolved in water and brought to *N*/50 acidity with acetic acid. Purified caolin was added to this ice-cooled solution and stirred vigorously, then filtered through a Buchner funnel. This adsorbate was suspended in ice cooled water and added to with *n*-ammonia to the end-concentration of 0.1%. After thorough shaking the yellowish coloured enzyme eluate was filtered by suction. The enzyme solution was mixed with equal volume of 95% alcohol and treated with aluminium hydroxide-A containing SO<sub>4</sub>. The enzyme adsorbed on alumina was eluted by passing carbon dioxide. After the repetition of the procedure with caolin and alumina a small volume of 1% tannin solution was added to the final extract upon which a precipitate of brown flake came out. This enzyme-tannin precipitate was rapidly separated and dissolved in alcohol which was acidified with diluted acetic acid, then treated once more with the caolin and alumina. This highly purified enzyme preparation was used in the author's spectrographic examination.

The activity of the preparation was estimated by determining the purpurogallin number, which is represented by Willstätter and Pollinger (1923) by mg of purpurogallin produced by 1 mg. of enzyme preparation in 5 minutes from 5 gm. of pyrogallol and 50 mg. of hydrogen peroxide dissolved in 2 liters of water at 20°C.

The reaction was stopped at the end of 5 minutes by the addition of dilute sulphuric acid, and the purpurogallin was extracted with ether, the ethereal extracts being made up to a total volume of 500 cc. The amount of purpurogallin present was then estimated in a colorimeter, the standard for comparison consisting of a solution of purpurogallin containing 100 mg. of purpurogallin in a liter of ether. The purpurogallin for the standard was prepared by the method of Perkin and Steven (1903). Since it was not feasible to use an ether solution as a standard, a 0.075 per cent solution of potassium dichromate in 0.5 normal hydrochloric acid was practically used which corresponds to 0.01 per cent purpurogallin solution in ether as described by Kodama and Masamune (1931). The preparation obtained by the author and submitted for the spectrographic examination had a purpurogallin number 3700.

The spectrographic examination of the highly purified enzyme preparation showed that the enzyme possesses two sharp selective absorption bands in the ultra-violet, the peaks of which being 400 and 283 m $\mu$ , and the end-absorption at 240 m $\mu$  at pH 7 as shown

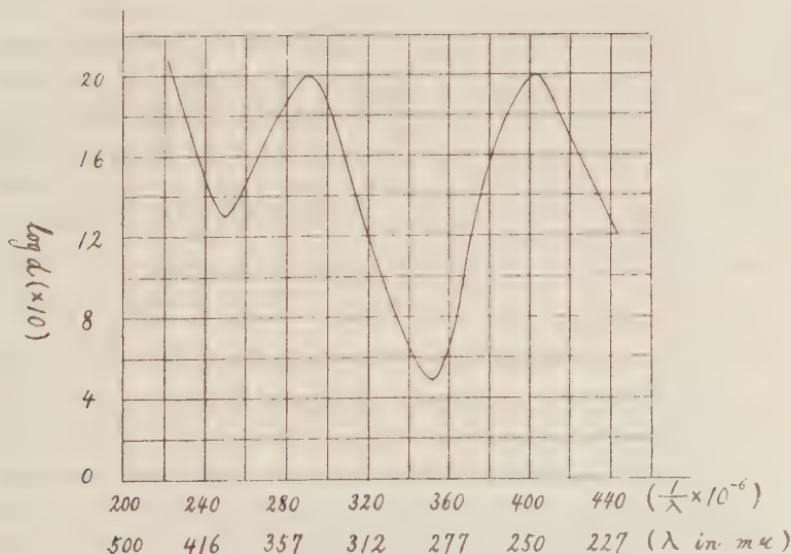


Fig. 2. Absorption curve of peroxidase.

in Fig. 2. The substance which showed a selective absorption band at  $400 \text{ m}\mu$  would be a porphyrine and the one which showed a band at  $283 \text{ m}\mu$  would be proteins as discussed in the previous study on xanthine oxidase and catalase. As the author detected the typical iron line spectrum in the highly purified peroxidase preparation by means of emission spectra, it might be assumed that the molecule of peroxidase would be a compound of protein and porphyrine-iron-complex. As haemine has peroxidase activity, the porphyrine-iron-complex in peroxidase solution should be the active group of peroxidase as discussed by Kuhn, Hand and Florkin (1931), and the protein be a bearer of this enzyme.

The author is greatly indebted to Prof. Dr. K. Kodama for his kind criticisms and encouragements throughout this research.

#### REFERENCES.

Ficke, R. and Kaja, P. (1924) : Ber. d. deutsch. chem. G., **57**, 310.  
 Giri, K. V. (1934) : Bioch. Z., **275**, 106.  
 Itoh, R. (1935) : J. of Biochem., **22**, 139.  
 Kodama, K. and Masamune, H. (1931) : J. of Biochem., **14**, 475.  
 Kuhn, R., Hand, D. B., and Florkin, M. (1931) : Z. f. physiolog. Chem., **201**, 255.  
 Luers, H., and Sellner, E. (1925) : Wochenschrift f. Brauerei, **42**, 97, 103, 110.  
 Perkin, A. G. and Steven, B. (1903) : J. of the chem. S. **83**, 192.  
 Sherman, H. C., and Schlesinger (1915) : J. Am. chem. S. **37**, 1305.  
 Sherman, H. C. Caldwell, M. L., and Adams, M. J. (1926) : J. Am. Chem. Soc., **48**, 2947; J. of biolog. Chem., **88**, 294 (1930).  
 Sherman, H. C., Caldwell, M. L., and Doebebing, S. E. (1934) : J. of biolog. Chem., **104**, 501.  
 Willstätter, R. (1921) : Liebig's Annalen d. Chem., **422**, 47.  
 Willstätter, R., and Pollinger, A. (1923) : Liebig's Annalen d. Chem., **430**, 269.  
 Willstätter, R., and Schudel, G. (1918) : Ber. d. Chem. G. in Berlin, **51**, 780.  
 Willstätter, R., and Stoll, A. (1918) : Liebig's Annalen d. Chem., **416**, 21.  
 Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E., and Hesse, A. R. F. (1924) : Z. f. physiolog. chem., **142**, 14; (1932) : **204**, 197.  
 Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E. and Hesse, A. R. F. (1923) : Z. f. physiolog. Chem., **126**, 143.

## DURCHBLUTUNGSVERSUCHE DES MAGENS.

(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji.)

### XII. Mitteilung.

## Durchblutungsversuche des Magens mit Ornithin und mit Citrullin.

VON

KENICHI KITSUGAWA.

(Aus der inneren Klinik der medizinischen Fakultät zu Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 21. Oktober 1935)

Nach Muraoka (1934) wird das Arginin in der Magenwandung umgesetzt, um einerseits unter der Einwirkung der Arginase Ornithin und Harnstoff und anderseits Histidin zu bilden. Nach ihm wird ausserdem das Arginin zum Teil in der Magenwandung in unbekannter Weise verändert. Seit der experimentellen Untersuchung von Krebs und Henseleit (1932) mit Leberstückchen wurde zu Tage gebracht, dass in Bezug auf die Harnstoffbildung in der Leber Ornithin und Citrullin ausser dem Arginin eine wichtige Rolle spielen. Nach den zahlreichen Magenuntersuchungen in unserer Klinik gehen die verschiedenen chemischen Vorgänge in der Magenwandung genau gleich denen in der Leber vor sich. Nun führte ich Durchblutungsversuche des Magen mit Ornithin und Citrullin aus, wodurch ein Fortschritt auf dem Gebiete des chemischen Studiums des Magens erreicht werden dürfte.

### EXPERIMENTELLER TEIL.

Ornithin wurde aus dem Hydrolysate des Arginins, und Citrullin aus dem Presssaft von Wassermelonen gewonnen. Harnstoff und Ammoniak wurden nach Van-Slyke und Cullen, Aminosäure nach Van-Slyke bestimmt, und destillierbare Säure wurde unter saurer Reaktion mit Phosphorsäure destilliert, in einem Glas mit bestimmter Menge N/50-Natronlauge aufgenommen

und zurückzitriert. Um das Arginin, Histidin, Ornithin und Citrullin, welche nach Durchblutung sich im Blute befinden dürften, voneinander zu trennen, wurde das Blut zuerst mit Schenkscher Lösung enteiweisst, und in das Filtrat  $H_2S$  eingeleitet, filtriert und das Filtrat mit Natriumcarbonat neutralisiert, bis auf 500 ccm eingedampft,  $H_2SO_4$  zu 5% hinzugefügt, und Phosphorwolframsäure gefällt, wobei Arginin und Histidin, und wenig Ornithin sich setzen. Der Niederschlag wurde nach Kossel und Kutscher behandelt, um Arginin von Histidin zu trennen. Anderseits wurde das Filtrat im bekannter Weise mit Baryt behandelt, filtriert, und das Filtrat mit basischem Bleiacetat gefällt und filtriert. Das Filtrat mit  $H_2S$  behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde in Vacuum bis zu Syrup eingedampft, absoluter Alkohol eingegossen, wobei Ornithin in Lösung geht. Das Ornithin wurde mit Salzsäure und Methylalkohol gereinigt. Aus dem Rückstand wurde das Citrullin durch Silberbarytfällung rein ausgeschieden. Die Durchblutungen wurden ganz genau, wie diejenigen von Matsuoka (1933), ausgeführt.

#### *Die Versuche mit Ornithin.*

Nach der Durchblutung des Magens mit Ornithin stieg der Wert des Ammoniaks und der destillierbaren Säure im Blute deutlich auf, wogegen der Aminostickstoffwert deutlich absank; der Harnstoffstickstoffwert blieb fast unverändert, wie in Tabelle I gezeigt wird. Die letzte Erscheinung bedeutet nicht nur eine Verschiebung des Harnstoffwertes im Blute, sondern eine deutliche Vermehrung, weil der Harnstoff in der Magenwand unter ureatischer Einwirkung leicht zersetzt wird, wie von Sumida (1935) schon gezeigt wurde und wie in meinen Kontrollversuchen (Tabelle II) tatsächlich bestätigt wird. Aus dem Resultate geht sicher hervor, dass das Ornithin in der Magenwandung umgesetzt wird, um zum Teil Harnstoff und Ammoniak zu bilden. Das Ammoniak, welches dabei neu gebildet wurde, wurde im Magensaft reichlich vorgefunden. Das Blut von Versuch 1 bis 5 wurde in eine Schale zusammengebracht und aufgearbeitet, um Ornithin und Citrullin quantitativ zu bestimmen, und das Blut von Versuch 6 und 7 wurde

TABELLE I. Hauptversuche.

Nr.	Durchblutungss- dauer min.	Blutmenge cc.	Oxalatmenge gr. cc.	Blut				Mageninhalt			
				Harnstoff N. mg %		Ammoniak N. mg %		Aminosäure N. mg %		Destillierbare Säure in 100 cc. Blut (n/50 NaOH) cc.	
				vor	nach	vor	nach	vor + Ornithin	nach	vor	nach
1	2.0	400	0.52	14.00	12.32	0.28	0.28	16.26	30.20	3.0	5.16
2	2.5	400	0.45	16.13	17.08	0.11	2.52	22.82	35.09	10.0	1.68
3	2.5	400	0.50	8.52	8.76	0.84	3.64	13.14	29.72	23.15	0.6
4	2.5	400	0.50	2.52	1.96	0	1.96	11.69	27.71	21.70	0.5
5	2.5	400	0.48	8.34	5.04	0.14	2.24	7.38	24.11	11.35	0.3
6	2.0	400	0.42	6.41	5.88	0	1.68	25.98	37.96	32.67	0.3
7	3.0	400	0.42	5.32	9.13	0.84	2.07	26.62	38.67	32.60	0.4
im Durch- schnitt				8.75	8.60	0.32	2.06	17.70	32.21	25.34	0.37
										0.75	
										14.43	1.70
										9.16	18.82

TABELLE II. Kontrollversuche.

Nr	Durchblutungsdauer cc. Zeit	Blutmenge cc.	Blut						Mageninhalt					
			Harnstoff N. mg %		Ammoniak N. mg %		Aminosäure N. mg %		Destillierbare Säure in 110 cc. Blut (n/50 NaOH)		Ammoniak N. mg %		Aminosäure N. mg %	
			vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach	vor	nach
1	2.5	300	10.36	2.97	0	0.95	14.11	12.17	0.60	0.56	60.0	1.12	3.92	17.02
2	2.0	300	13.38	8.40	0.39	2.02	26.11	14.76	0.36	0.36	15.0	1.85	4.07	18.16
3	2.5	250	11.09	5.99	0.11	1.01	7.90	6.21	0.30	0.30	8.0	1.96	5.04	25.39
im Durchschnitt	2.3	283	11.61	5.79	0.17	1.32	16.04	11.05	0.42	0.41	27.7	1.64	4.34	20.19

zur Untersuchung von Histidin und Arginin benutzt. Das Resultat wird in Tabelle III und IV gezeigt. In dieser Untersuchung ist es sehr merkwürdig, dass der Stickstoff in der Argininfraktion in fast doppelt so grosser Menge wie im Kontrollversuche sich vorfand, während der Stickstoffwert in der Citrullin- und Histidinfraktion, ebenso wie im Kontrollversuche fast unverändert blieb.

TABELLE III.  
Hauptversuche. Kontrollversuche.

Nummer	Gebrauchte Blutmengen cc.	Berechnete, gebrauchte Ornithinmenge g.	Bekommene Ornithin N. mg %	Citrullin-fraktion N. mg %		
					Hauptversuche.	Kontrollversuche.
1-5	1380	1.6835	222.90	1.35		

TABELLE IV.  
Hauptversuche. Kontrollversuche.

Nummer	Gebrauchte Blutmengen cc.	Berechnete, gebrauchte Ornithinmenge g.	Histidin-fraktion N. mg %	Arginin-fraktion N. mg %		
					Hauptversuche.	Kontrollversuche.
6	320	0.336	1.75	4.03		
7	310	0.351	2.08	4.29		
im Durchschnitt	315	0.344	1.92	4.16		
Nummer	Gebrauchte Blutmengen cc.		Histidin-fraktion N. mg %	Arginin-fraktion N. mg %		
1-3	540		2.22	2.18		

#### Die Versuche mit Citrullin.

Nach Durchblutung des Magens mit Citrullin stieg der Wert des Ammoniaks und der destillierbaren Säure im Blute deutlich auf, wogegen der Aminostickstoffwert deutlich absank, z.B. stieg Ammoniak von 0,39 mg% bis auf 3,36 mg%, Säurewert von 0,25 bis auf 0,45 und der Aminostickstoff sank von 35,45 mg% bis

TABELLE V.

Nr.	Durchblutungszeit	Blutmenge cc.	Citrullinmenge cc.	Blut				Mageninhalt			
				Harnstoff N. mg %		Aminosäure N. mg %	Destillierbare Säure in 100 cc. Blut(n/50) NaOH cc.	Menge cc.		Menge cc.	
				vor	nach			vor	nach	vor	nach
1	3.0	350	0.27105	5.11	5.04	0.05	2.52	35.06	17.79	0.30	0.80
2	2.5	300	0.27105	16.40	16.41	0.11	2.63	30.65	34.41	0.07	0.10
3	2.5	350	0.27105	14.99	12.32	0.44	3.64	41.58	45.90	0.36	0.40
4	3.0	360	0.27105	15.52	15.68	1.09	4.48	37.39	26.71	0.30	0.48
5	2.5	380	0.27105	16.09	11.52	0.27	3.53	32.59	21.39	0.20	0.48
Im Durchschnitt		348	0.27105	14.42	12.19	0.39	3.36	35.45	29.24	0.25	0.45

29,24 mg%. Bei diesem Versuche wurde der Harnstoff im Blute deutlich vermindert vorgefunden, z.B. stieg er von 14,42 mg% bis 12,19 mg% ab. Aber der Verminderungsgrad des Harnstoffes ist nur gering, wenn man ihn mit dem Resultate im Kontrollversuche vergleicht, wo der Harnstoff in ausgezeichneter Weise verloren ging, wie in Tabelle II gezeigt wurde. Aus dem Resultate geht hervor, dass das Citrullin in der Magenwandung umgesetzt wird, um zum Teil Ammoniak und wahrscheinlich auch Harnstoff zu bilden. In diesem Versuche wurden Ammoniak, besonders Harnstoff etwas reichlich im Magensaft vorgefunden.

Das Blut des 1 bis 5 Versuches wurde in ein Glass zusammengebracht und aufgearbeitet, um Citrullin, Histidin, Arginin und Ornithin quantitativ zu untersuchen. Citrullin wurde zu einer Hälfte des Ausgangswertes zurückgewonnen. Bei diesem Versuche ist es sehr merkwürdig, dass Argininstickstoff, besonders Ornithinstickstoff in fast 5 fach so grosser Menge, wie im Kontrollversuche, vorgefunden wurden.

TABELLE VI.  
Hauptversuche.

Nummer	Gebrauchte Blutmense cc.	Berechnete Gebrauchte Citrullin- menge mg	Bekom- mene Citrullin- menge mg	Histidin- fraktion N. mg %	Arginin- fraktion N. mg %	Ornithin- fraktion N. mg %
1-5	1390	1082.65	506.74	1.52	3.54	5.32

Kontrollversuche.

Nummer	Gebrauchte Blutmengen cc.	Citrullin- fraktion N. mg %	Histidin- fraktion N. mg %	Arginin- fraktion N. mg %	Ornithin- fraktion N. mg %
1-3	540	1.04	2.22	2.18	1.07

ZUSAMMENFASSENDE BETRACHTUNG.

In den Durchblutungsversuchen beobachtete ich, dass die

beiden Substanzen in der Magenwandung leicht in die Argininfraktion übergehen und anderseits Ammoniak und höchstwahrscheinlich auch Harnstoff liefern, wenn auch der letztere Vorgang etwas unbequem nachzuweisen war, weil die ureatische Wirkung in der Magenschleimhaut existiert. Die Annahme von Krebs über den Chemismus zwischen Ornithin, Citrullin und Arginin in Bezug auf Harnstoffbildung in der Leber, gilt in der Magenwandung auch. Bei dieser Untersuchung interessierte es mich nicht wenig, dass Citrullin in der Magenwandung nicht nur Arginin, sondern auch eine grosse Menge Ornithin lieferte.

#### LITERATUR.

Citrullin, M. Wada (1930): Biochem. Z., **224**, 420.  
Krebs und Henseleit (1932): Kl. Wschr., S. 1137.  
Matsuoka (1933): The Journal of Biochemistry, **17**, 267.  
Muraoka (1935): The Journal of Biochemistry, **21**, 271.  
Sumida (1935): The Journal of Biochemistry, **21**, 301.

# ÜBER DIE d, l-TOLYLALANINE UND IHREN BAKTERIELLEN ABBAU.\*

VON

TAKAOKI SASAKI UND ICHIRO OTSUKA.

(*Sasaki-Laboratorium, Tokio.*)

(Eingegangen am 22. Oktober 1935)

Tolylalanine wurden bis jetzt nicht in der Natur gefunden. *p*-Tolylalanin wurde schon früher von H. D. Dakin (1911) dargestellt. Dabei studierte er die physiologische Wirkung. *m*-Tolylalanin wurde zuerst von L. Böhm (1914) synthetisiert. Von ihm und von Fromherz und Hermanns (1914) wurden die Stoffwechselversuche angestellt.

Wenn *p*-Tolylalanin auch bis jetzt nicht in der Natur aufgefunden ist, so weist der charakteristische Fliedergeruch von *p*-Tolylacetaldehyd (K. Kling, 1908) unter Umständen auf sein phytochemisches Interesse hin.

Das Studium des bakteriellen Abbaus der Tolylalanine ist somit nicht ohne Interesse und könnte auch für Physiologie und Pathologie der Lebenserscheinung eventuell von Bedeutung sein.

Zu diesem Zweck stellten wir nach Sasakis Glycinanhydridmethode (1921) *p*-, *m*- und das unseres Wissens noch nicht bekannte *o*-Tolylalanin dar, und setzten es der Einwirkung der Proteusbakterien aus. Durch diese Bakterien isolierten wir aus *d, l-p*-Tolylalanin unter der Bedingung, die nach unserer Erfahrung mehr saure Abbauprodukte zu liefern pflegt, die entsprechende optisch aktive *p*-Tolylmilchsäure, wenn auch in einer geringen Ausbeute. Aus *m*- und *o*-Tolylalanin gelang es uns leider, trotz vielfachen Versuche nicht, die Oxysäure zu gewinnen, sondern wir gewannen die verwendeten Tolylalanine grösstenteils zurück.

\* Diese Arbeit ist schon vor mehreren Jahren zum Abschluss gekommen und bis jetzt unpubliziert vorbehalten. Da wir nun in ein anderes Arbeitsgebiet eintreten, erlauben wir, sie der Öffentlichkeit zu übergeben.

Mit kleiner Probe konstatierten wir sogar, dass drei Isomere von Tollylalanin zum Wachstum der Bakterien ungeeignet waren. Beim Zusatz von Paraverbindung zur Nährösung wurden alle Keime nach 10 Tage vollständig vegetationsunfähig, auch bei Metaverbindung nach derselben Zeit, bei Orthoverbindung nach 8 Tagen. Die *l*-Tyrosin zugesetzten Kulturen von denselben Bakterien waren dagegen noch nach weit längerer Zeit vegetationsfähig.

#### CHEMISCHER TEIL.

##### *Synthese des o-, m- und p-Tollylalanins.*

###### *I. Kondensation des Glycinanhydrids mit o-Tollylaldehyd zu 3.6-Bis-(o-Methylbenzal)-2.5-diketo-piperazin.*

2,3 g Glycinanhydrid wurden fein pulverisiert, mit 4,8 g *o*-Tollylaldehyd, 6,5 g frisch geschmolzenem Natriumacetat und 10,2 g Essigsäureanhydrid versetzt und 6 Stunden im Ölbad auf 120–130° erhitzt. Die erkaltene Reaktionsmasse wurde mit heissem Wasser digeriert, abgesaugt und sorgfältig mit warmem Wasser, sodann mit warmem Alkohol gewaschen. Das so gewonnene, schwach gelbe Krystallpulver wog trocken 2,9 g, entsprechend 47% der Theorie.

Die Substanz schmilzt bei 273–274°, ist wenig löslich in heissem Eisessig, fast unlöslich in üblichen organischen Solventien. Die aus Eisessig umkrystallisierte Substanz wurde zur Analyse im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,1017 g Subst. :	0,2799 g CO <sub>2</sub> ,	0,9522 g H <sub>2</sub> O,
0,1226 g „ :	7,8 ccm N(25°, 747, 1 mm)	
C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	Ber. C 75,43, H 5,75, N 8,81	
	Gef. „ 75,02, „ 5,71, „ 8,56	

###### *II. Reduktion und Spaltung des 3.6-Bis-(o-Methylbenzal)-2.5-diketo-piperazins zu β-(o-Tollyl)-α-alanin.*

3 g Kondensationsprodukt wurden mit 30 ccm Jodwasserstoff-säure (D. 1,7) und 1 g rotem Phosphor versetzt und 8 Stunden unter Rückflusskühlung gekocht. Nach Zusatz von warmem Wasser wurde das Reaktionsprodukt filtriert und das Filtrat unter ver-

minderem Druck bis zur Trockenheit abdestilliert. Der Destillationsrückstand wurde in Wasser aufgelöst und die Lösung mit Natronlauge neutralisiert. Dabei schieden sich 3,0 g schwach bräunlich-gelbe Krystalle aus. Die so erhaltene, rohe Aminosäure wurde in verdünnter Salzsäure gelöst, die Lösung mit Tierkohle behandelt und mit Ammoniak neutralisiert. Die beim Stehen ausgeschiedenen, weissen Krystalle wogen trocken 2,8 g, mithin 83% der Theorie.

Die aus siedendem Wasser umkristallisierten farblosen Krystallnadeln zersetzen sich bei 259–260°, sie sind löslich in siedendem Wasser, fast unlöslich in Alkohol.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,0833 g	Subst.:	0,2036 g CO <sub>2</sub> , 0,0563 g H <sub>2</sub> O,
0,1980 g	" :	13,2 ccm N(13°, 765, 1 mm)
C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> N	Ber. C	66,99, H 7,32, N 7,82
	Gef. "	66,63, " 7,56, " 8,01

*III. Reduktion des 3,6-Bis-(o-Methylbenzal)-2,5-diketopiperazin zu 3,6-Bis-(o-Methylbenzal)-2,5-diketopiperazin (o-Tolylalaninanhydrid).*

2 g Kondensationsprodukt wurden in 300 ccm Eisessig unter Erwärmung aufgelöst und darauf 10 g Zinkstaub portionsweise hinzugefügt. Das Gemisch wurde 15 Stunden unter Rückflusskühlung gekocht und sodann heiß filtriert. Der Destillationsrückstand des Filtrates wurde zuerst mit warmem Wasser digeriert, abgesaugt und gut gewaschen; sodann wurde er aus siedendem Alkohol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 1,8 g. Aus der Mutterlauge liessen sich noch 0,1 g Substanz gewinnen. Die Gesamtausbeute betrug mithin 95% der Theorie. Die Substanz ist löslich in heißem Alkohol und warmem Eisessig, schmilzt bei 228–230°.

Zur Analyse wurde die aus heißem Alkohol umkristallisierte Substanz im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,0814 g	Subst.:	0,2218 g CO <sub>2</sub> , 0,0543 g H <sub>2</sub> O,
0,1028 g	" :	8,8 ccm N(31°, 737 mm)

$C_{20}H_{22}O_2N_2$  Ber. C 74,49 H 6,88 N 8,70  
Gef. „ 74,26 „ 7,35 „ 9,32

*IV. Kondensation des Glycinanhydrid mit m-Tolylaldehyd zu 3,6-Bis-(m-Methylbenzal)-2,5-diketo-piperazin.*

5,7 g Glycinanhydrid wurden mit 15 g *m*-Tolylaldehyd, 16,4 g frisch geschmolzenem Natriumacetat und 20,4 g Essigsäureanhydrid versetzt und im Ölbad 6 Stunden lang auf 130–140° erhitzt. Die Reaktionsmasse wurde zuerst mit heissem Wasser und sodann mit warmem Alkohol gewaschen. Die Ausbeute an schönen gelben Krystallen betrug 12 g = 76% der Theorie.

Die Substanz ist löslich in heissem Eisessig, unlöslich in Wasser und Alkohol, schmilzt bei 246–247°.

Zur Analyse wurde die Substanz aus siedendem Eisessig umkrystallisiert und dann bei 100° im Vakuum getrocknet.

0,1011 g Subst.: 0,2791 g  $CO_2$ , 0,0531 g  $H_2O$ .  
0,1499 g „ : 11,2 cem N(13°, 765, 1 mm)  
 $C_{20}H_{18}O_2N_2$  Ber. C 75,43 H 5,75 N 8,81  
Gef. „ 75,27 „ 5,84 „ 8,98

*V. Reduktion und Spaltung des Kondensationsprodukts zu  $\beta$ -(*m*-Methylphenyl)-*a*-alanin (*m*-Tolylalanin)*

5 g Kondensationsprodukt wurden mit 2,5 g rotem Phosphor und 50 cem Jodwasserstoffsäure (D. 1,7) versetzt und 6 Stunden lang unter Rückflusskühlung gekocht. Nach dem Erkalten wurde die Reaktionsmasse unter Zusatz von Wasser filtriert. Das Filtrat wurde unter verminderter Druck bis zur Trockne abdestilliert. Der Rückstand wurde in Wasser aufgelöst und die Lösung mit Natronlauge neutralisiert. Dabei schieden sich 4,8 g schwach bräunlicher Niederschlag aus. Die rohe Ausbeute betrug mithin 86% der Theorie.

Die Substanz wurde zur Reinigung in verdünnter Salzsäure warm aufgelöst und mit Tierkohle behandelt. Das Filtrat wurde mit Ammoniak neutralisiert. Die ausgeschiedenen, farblosen Krystalle zersetzen sich bei 245–246°, sie sind löslich in siedendem Wasser, fast unlöslich in Alkohol.

Zur Analyse wurde die Substanz noch einmal aus siedendem Wasser umkristallisiert und im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,0901 g Subst.: 0,2198 g CO<sub>2</sub>, 0,0605 g H<sub>2</sub>O.

0,2019 g „ : 12,6 ccm N(12°, 761,5 mm)

C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N Ber. C 66,99 H 7,32 N 7,82

Gef. „ 66,48 „ 7,44 „ 7,50

*VI. Reduktion des Kondensationsproduktes zu 3,6-Bis (m-Methylbenzyl)-2,5-diketo-piperazin (m-Tolyl-alaninanhydrid)*

3 g Kondensationsprodukt wurden in 500 ccm siedendem Eisessig aufgelöst und unter portionsweisem Zusatz von 15 g Zinkstaub 15 Stunden lang am Rückflusskühler gekocht. Das Filtrat wurde unter verminderter Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde zuerst mit warmem Wasser digeriert, abgesaugt, sorgfältig aus siedendem Alkohol umkristallisiert. Die Ausbeute an reiner Substanz betrug 2,8 g = 93% der Theorie.

Die Substanz ist löslich in heissem Alkohol und warmem Eisessig, schmilzt bei 187–188°.

Zur Analyse wurde die aus siedendem Alkohol umkristallisierte Substanz im Vakuum bei 100° getrocknet.

0,0974 g Subst.: 0,2669 g CO<sub>2</sub>, 0,0626 g H<sub>2</sub>O.

0,1816 g „ : 15,0 ccm N(29°, 738, 2 mm)

C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> Ber. C 74,49 H 6,88 N 8,70

Gef. „ 74,74 „ 7,19 „ 9,08

*VII. Kondensation des Glycinanhydrids mit p-Tolylaldehyd zu 3,6-Bis-(p-Methylbenzal)-2,5-diketo-piperazin.*

5,7 g Glycinanhydrid, 15 g p-Tolylaldehyd, 16,4 g Natriumacetat (Wasserfrei) und 20,4 g Essigsäureanhydrid wurden genau wie oben bei der o- und m-Verbindung kondensiert. Die Ausbeute an gelbem Krystallpulver betrug 12,3 g = 77% der Theorie.

Die Substanz ist löslich in siedendem Eisessig, unlöslich in Wasser, Alkohol, Benzol.

Zur Analyse wurde die Substanz aus siedendem Eisessig umkristallisiert und dann bei 100° im Vakuum getrocknet.

0,1122 g Subst.: 0,3091 g CO<sub>2</sub>, 0,0550 g H<sub>2</sub>O.

0,1270 g „ : 10,4 cem N(25°, 747,4 mm)

C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> Ber. C 75,43 H 5,75 N 8,81

Gef. „ 75,13 „ 5,53 „ 9,23

*VIII. Reduktion und Spaltung des Kondensationsprodukts zu β-(p-Methylphenyl)-α-alanin(p-Tolylalanin)*

5 g Kondensationsprodukt wurden mit 50 ccm Jodwasser-stoffsäure (D. 1,7) und 2 g rotem Phosphor 8 Stunden unter Rück-flusskühlung gekocht. Die Reaktionsmasse wurde genau wie oben bei der *o*- und *m*-Verbindung behandelt. Die Ausbeute an reiner Substanz betrug 4,8 g = 86% der Theorie.

Die Substanz ist löslich in siedendem Wasser, fast unlöslich in Alkohol, zersetzt sich bei 278–279°.

Zur Analyse wurde die Substanz aus siedendem Wasser um-krystallisiert und dann bei 100° im Vakuum getrocknet.

0,1528 g Subst.: 0,3754 g CO<sub>2</sub>, 0,0990 g H<sub>2</sub>O

0,2011 g „ : 12,9 cem N(13°, 765, 1 mm)

C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N Ber. C 66,99 H 7,32 N 7,82

Gef. „ 67,02 „ 7,26 „ 7,77

*IX. Reduktion des Kondensationsprodukts zu 3,6-Bis-(p-Methylbenzyl)-2,5-diketo-piperazin(p-Tolylalaninanhydrid).*

2 g Kondensationsprodukt wurden in 300 ccm siedendem Eisessig aufgelöst und unter portionsweisem Zusatz von 10 g Zink-staub 15 Stunden lang am Rückflusskühler gekocht. Die Reaktionsmasse wurde ganz ebenso wie bei der Reduktion des *o*- und *m*-Kondensationsproduktes behandelt. Die Ausbeute an reiner Substanz betrug nach dem Umkrystallisieren aus siedendem Alkohol 1,7 g = 85% der Theorie.

Die Substanz ist löslich in heissem Alkohol und warmem Eisessig, unlöslich in Wasser, schmilzt bei 257–258°.

Zur Analyse wurde die Substanz aus siedendem Alkohol um-krystallisiert und dann bei 100° im Vakuum getrocknet.

0,1037 g Subst.: 0,2826 g CO<sub>2</sub>, 0,0628 g H<sub>2</sub>O  
 0,1453 g „ : 11,9 ccm N (29°, 738,2 mm)  
 C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> Ber. C 74,49 H 6,88 N 8,70  
 Gef. „ 74,35 „ 6,78 „ 8,99

#### BAKTERIOLOGISCHER TEIL.

Die zum Versuche verwendeten Proteinsbakterien waren derjenige Stamm, welcher aus *l*-Tyrosin in guter Ausbeute *d,p*-Oxyphenylmilchsäure gebildet hatte. Die Versuchsbedingung war dieselbe wie für die vorangehende Mitteilung mit *l*-Tryptophan von T. Sasaki und I. Otsuka (1921). 1 Kolben mit 2 g *p*-Tolylalanin wurde aufgearbeitet. Anfangs-PH=7,4. Die Verweildauer im Brutschrank 40 Tage. End-PH=7,0. Wir dampften den unter Zusatz von Natriumcarbonat schwach alkalisch gemachten Kolbeninhalt in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade bis zum Sirup ein, der dann mit siedendem Alkohol erschöpfend und wiederholt extrahiert wurde. Den Rückstand vom abgedampften Alkohol lösten wir in Wasser auf. Die unter Zusatz von verdünnter Schwefelsäure stark sauer gemachte Lösung wurde sodann mittels des Kumagawa-Sutoschen Flüssigkeitsextraktors mit Äther erschöpfend extrahiert. Die nach Abdampfen des Äthers gewonnene sirupöse Masse wurde im Eisenschrank in vacuo aufbewahrt. Bei der Aufbewahrung von mehreren Monaten schieden sich keine Krystalle aus. Die sirupöse Masse wurde in warmen Wasser aufgelöst, dann mit wenig Tierkohle behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde mit Ammoniak neutralisiert, sodann mit Merkuracetatlösung gefällt. Die Niederschlag wurde in wässriger Suspension mit Salzsäure behandelt. Die Lösung wurde wiederum mit Äther extrahiert. Es gelang uns, nach dem Abdampfen des Äthers ein schönes Krystall von 0,15 g zu gewinnen. Es schmolz bei 79–80° (unkorr.).

Die Substanz wurde über Phosphorsäureanhydrid bei Zimmertemperatur in vacuo getrocknet.

7,88 mg Subst.: 19,24 mg CO<sub>2</sub>, 4,78 mg H<sub>2</sub>O  
 C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub> Ber. C 66,63 H 6,71  
 Gef. „ 66,59 „ 6,79

5,36 mg Subst.: 13,1 mg CO<sub>2</sub>, 3,31 mg H<sub>2</sub>O  
 C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>8</sub> Ber. C 66,63 H 6,71  
 Gef. „ 66,66 „ 6,91

Die wässrige Lösung, welche in 10 cem 0,1258 g Substanz und 0,70 cem *n*-Natronlauge enthielt, drehte im 1 dm-Rohr bei 20° Quecksilberlicht 0,35° nach rechts.

### Mithin

$$[\alpha]_{\text{Hg}}^{20} = +27,82^\circ$$

Wir arbeiteten mit *m*- und *o*-Tolylalanin wie bei *p*-Verbindung. Es gelang uns leider nicht, die Oxysäuren zu isolieren.

### ZUSAMMENFASSUNG.

3 *d,l*-Tolylalanine, *p*-, *m*- und bis jetzt noch nicht dargestellter *o*-Körper, wurden mittelst der Glycinanhidridmethode synthetisiert. Bei den mit 3 Tolylalanine ausgeführten, bakteriellen Abbauversuchen hat sich herausgestellt, dass die mit Tolylalanine zugesetzten Kulturen für Proteusbakterien im Gegensatz zu den in der Natur vorkommenden Aminosäuren vegetationsunfähig sind.

Aus *d,l-p*-Tolylalanin wurde dabei die bisher unbekannte rechtsdrehende  $\beta$ -(*p*-Tolyl)- $\alpha$ -Milchsäure in geringer Ausbeute gewonnen. Andere 2 *d,l*-Tolylalanine liessen die Bakterien unberührt.

### LITERATUR.

- Böhm, L. (1914): Zeitschr. f. physiol. Chem., **89**, 101.
- Dakin, H. D. (1911): Journ. of Biol. Chem., **9**, 151.
- Fromherz, K. u. Hermanns, L. (1914): Zeitschr. f. physiol. Chem., **89**, 113.
- Kling, K. (1908): Chem. Zentralbl., **1**, 951.
- Sasaki, T. (1921): Ber. Dtsch. Chem. Ges., **54**, 163.
- Sasaki, T. u. Otsuka, I. (1921): Biochem. Zeitschr., **121**, 167.

## BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER BIOCHEMIE DES WURMFORTSATZES.

VON

SEIICHI SUMIDA.

(*Aus der inneren Klinik der med. Fakultät zu Nagasaki, Japan.  
Vorstand: Prof. Dr. M. Tsudji.)*

(Eingegangen am 25. Oktober 1935)

Während das Problem des Wurmfortsatzes von verschiedenen Autoren klinisch sowie experimentell reichlich untersucht worden ist, bleibt doch die wesentliche physiologische Bedeutung desselben unklar. Nach Berlazki (1903) und Strashesko (1904) besitzt der Appendixsaft die Wirkungen von Erepin, Amylase, Maltase und Invertase, was von Ri (1930) nachgeprüft wurde. Beziiglich der fermentativen Wirkungen des Appendixsaftes gibt es ausserdem die Arbeiten von Funke (1858), Scobolew (1903), Mac Ewen (1904), Meisel (1904), Ustjanzew und Zunz (1905), Ellenberger (1906) und Heile (1914). Ausser den fermentativen Forschungen sind chemische Untersuchungen über den Appendix nur wenig gemacht worden. Nach Berlazki und Strashesko besteht der Appendixsaft des Hundes aus zwei Teilen: einem dünnflüssigen und einem festeren, Klümpchen bildenden Teile. Der Saft besitzt einen eigenartigen aromatischen Geruch und seine Reaktion ist alkalisch. Spezifisches Gewicht ist gleich 1,06131. Der flüssige Teil enthält 98,60% Wasser, 0,63% organische und 0,68% anorganische Substanzen (nach Babkin 1928 zitiert). Ganz neuerdings nimmt Ochi (1928-1932) an, dass der Wurmfortsatz eine Bildungsstelle des Hormons für die Darmbewegung ist, welches aus cholinähnlicher Substanz besteht. Das ist alles, was wir über die chemischen Eigenschaften des Appendixsaftes wissen. Auf Veranlassung von Prof. M. Tsudji unternahm ich es, den Wurmfortsatz und seinen Saft biochemisch zu untersuchen.

## I. Kapitel. Untersuchungen über den Appendixsaft.

Der Bequemlichkeit halber wurden Kaninchen zum Versuch gebraucht, welche mit Okara (Bohnenteigrückstand) mit Gemüsebeimischung gefüttert worden waren, weil der Appendix des Kaninchens sehr lang und gross ist. Der Bauch des Tieres wurde auf dem Operationstisch aseptisch geöffnet. Der Wurmfortsatz wurde in seinem Wurzelteil angeschnitten und die beiden Schnittstellen wurden fest vernäht, wobei die Blutgefäße und Nervenfasern im Mesenteriolum proc. vermiformis sorgfältig verschont wurden. Nun wurde der Spitzteil des Wurmfortsatzes mit seiner Vorderfläche an die rechten Bauchwand angenäht, um eine Fistel zu bilden. Die Fistel wurde mit einem weichen Gummiröhrchen verbunden. Nach der Operation wurde der isolierte Wurmfortsatz mit lauwarmer physiologischer Kochsalzlösung zeitweise durch die Fistel langsam gespült. Eine Woche nach der Operation wurde der Saft zum Versuche gebraucht. Bei Sammlung des Saftes wurde die Fistel einige Stunden geklemmt, und dann wurde der Saft mit Pipette langsam sehr schonend abgesaugt. In Betreff des Sekretionsmechanismus des Appendix des Hundes beläuft sich die stündliche Leistung der sekretorischen Arbeit auf 0,03–0,12 ccm (Berlazki-1903). Nach Ri wird der Saft 4–5 Stunden nach Nahrungsaufnahme 1–1,5 ccm pro Stunde sezerniert. Bei Kaninchen wurde der Saft bei normaler Fütterung täglich auf 5–15 ccm, im Durchschnitte 9,5 ccm, sezerniert, indem der Saft alle 3–5 Stunden aufgenommen wurde. Wenn der Saft in seiner Menge zur Untersuchung nicht genügte, wurde er von mehreren Kaninchen in ein Gefäß gesammelt und zusammen untersucht.

### I. PHYSIKOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DES APPENDIXSAFTES\*

Der Appendixsaft des Kaninchens besteht, ganz ähnlich wie beim Hunde, aus einem dünnflüssigen und einem festeren, wölkige

---

\*) Vortrag auf der VI. Tagung der Nagasaki Med. Gesellschaft (November 1929), und auf der IV. Tagung der Gesellschaft für Gastroenterologie (Osaka, April 1930).

Klümpechen bildenden Teile. Der erstere ist wasserklar, manchmal eine Spur opalescent. Der letztere bildet weissliche halbdurchsichtige Schleimflocken. Der Saft riecht eigenartig aromatisch.

#### *1. Wasserstoffionenkonzentration.*

Der Saft wurde abfiltriert. Das Filtrat diente zur Untersuchung. Der Saft reagiert gegen Lackmus stark alkalisch. Der Wasserstoffionenkonzentration ( $=\text{PH}$ ) wurde durch Gaskettenmethode mit Potentiometer ermittelt. Gelegentlich konnte ich Appendixcystensaft bei Appendikotomie des Menschen aus der chirurgischen Klinik und Appendixsaft des Hundes, der Appendixfistel trug, je einen Fall bekommen. Der Wert schwankte zwischen 8,01 bis 9,04 beim Kaninchen, und betrug beim Hunde 8,62, beim Menschen 9,10.

#### *2. Spezifisches Gewicht.*

Das spezifische Gewicht wurde mittels Pyknometers stets bei  $20^{\circ}\text{C}$  bestimmt. Das spezifische Gewicht des Saftes schwankte zwischen 1,00609 bis 1,00812. Also ist der Wert beim Kaninchen viel niedriger als beim Hunde. Die auf den letzteren bezüglichen Werte sind schon von Berlazki und Strashesko angegeben worden.

#### *3. Viskosität.*

Das Hesssche Viskosimeter wurde angewandt. Die Viskosität schwankte zwischen 1,10 bis 1,35 bei Zimmertemperatur.

#### *4. Oberflächenspannung.*

Die Oberflächenspannung wurde mittels Brinkmannscher Torsionswage bei Zimmertemperatur bestimmt. Der Wert schwankte zwischen 41,9 bis 51,2.

#### *5. Gefrierpunkterniedrigung, Osmotischer Druck und molekulare Konzentration.*

Die Gefrierpunkterniedrigung wurde nach Beckman bestimmt und der osmotische Druck und die molekulare Konzentra-

TABELLE I.

Nr. der Tieres	K. G. (kg)	Operations- Datum	Verlustes- Menge Liter	Oberfläche- spannung Dyn/cm	Menge (cm)	Verlustes- Dattum	Verlustes- Menge Liter	Oberfläche- spannung Dyn/cm	Menge (cm)	Geöffnungs- temperatur- (Zimmer- temperatur)	Viskosität Gefrierpunkt- temperatur	Osmotische Druck bei 0°C.	Spezifisches Gewicht (20°C)	$C = \frac{\Delta}{\Delta'}$	Hd	Bemerkungen		
																Hd		
I	7	2.5	16/IX 1929	24/IX	2	48.9 (20°C)	1.15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
II	16	2.6	25/X 1929	1/XI	6	45.2 (20°C)	1.20	0.60	7.85	0.324	—	—	—	—	—	—	—	—
III				2/XI	7	50.2 (17°C)	1.35	0.81	9.42	0.437	1.009812	—	—	—	—	—	—	—
IV	19	2.2	28/X 1929	3/XI	5	49.5 (17°C)	1.10	0.58	6.52	0.313	—	8.87	Kaninehen	—	—	—	—	—
V				4/XI	3	51.6 (18°C)	1.20	0.51	6.60	0.275	—	—	—	—	—	—	—	—
VI	23	2.3	4/XI 1929	9/XI	6	41.9 (15°C)	1.20	0.52	6.45	0.281	1.00617	9.04						
VII	25	1.9	61/XI 1929	11/XI	6	46.3 (15°C)	1.20	0.50	6.31	0.270	1.00609	9.00						
VIII				12/XI	12	47.0 (14°C)	1.17	0.61	7.81	0.329	1.00639	8.81						
IX	46	2.8	29/II 1930	23/III	13	50.4 (16°C)	1.20	0.60	7.73	0.324	1.00640	8.62						
X	53	3.1	17/III 1930	23/III	16	51.2 (16°C)	1.25	0.62	7.97	0.334	1.00651	8.64						
XI	—	6.8	5/III 1930	23/III	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8.62	Hund
XII	—	—	15/IV 1930	15/IV	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	9.10	Mensch

tion nach der Raoult-vant Hoff'schen Formel umgerechnet. Die Resultate werden in Tabelle I. zusammen gezeigt.

### 6. Spezifische Leitfähigkeit.

Die spezifische elektrische Leitfähigkeit wurde nach Kohlrausch mit Induktor und Telephon bestimmt. Die Resultate werden in Tabelle II. gezeigt.

TABELLE II.

Versuchs-Nr.	Nr. der Tiere	Datum	Spezifische elekt. Leitfähigkeit
I	(526 530)	9/II 1934	$16.23 \times 10^{-9}$
II	(545 547)	13/II „	$14.69 \times 10^{-9}$
III	(551 552)	16/II „	$17.24 \times 10^{-9}$
Durchschnittl.			$16.05 \times 10^{-9}$

## II. CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG DES APPENDIXSAFTES.\*)

Zur Bestimmung der festen Stoffe wurde die Flüssigkeit auf dem Wasserbade zur völligen Trockne abgedampft. Die getrockneten festen Stoffe wurden verascht. Die Aschenbestandteile wurden in wasserlösliche und wasserunlösliche Teile geteilt. Beim Hundappendixsaft fanden Berlazki und Strashesko die festen Substanzen auf 1,31 g%, die organischen Substanzen auf 0,63 g% und die anorganischen Substanzen auf 0,68 g%. Aber beim Kaninchenappendixsaft fand ich die festen Substanzen auf 1,1667 g%, die organischen Substanzen auf 0,2390 g% und die anorganischen Substanzen auf 0,9277 g%. Also ist das Mengenverhältnis der Substanzen im Appendixsaft je nach Art des Tieres verschieden (Tabelle III.).

\*) Vortrag auf der VII. Tagung der Nagasaki Med. Gesellschaft (November 1930, 1931), und auf der VI. Tagung der Gesellschaft für Gastroenterologie (Kyoto, April 1932).

TABELLE III.

Versuchs-Nr.	Menge des verwend. Materials (cem)	Feste Stoffe g.	Organische Stoffe g.	Anorganische Stoffe	
				Wasserlös.	Wasserunlös.
I	100	1.1438	0.2350	0.9078	0.0010
II	100	1.1897	0.2430	0.9443	0.0024
Durchschnittl.		1.1667	0.2390	0.9260	0.0017

### 1. Anorganische Stoffe.

Der wasserunlösliche Teil der Aschensubstanz wurde in verdünnter Salzsäurelösung gelöst und mit der Lösung des wasserlöslichen Anteils vereinigt in einem Messkolben aufgenommen. Ein aliquoter Teil davon wurde zur quantitativen Bestimmung gezogen. Chlor wurde nach Volhard, Natrium und Kalium als Platinsalz, Calcium als Calciumoxalat, Phosphor nach Neumann, Magnesium als Magnesiumpyrophosphat und gesamter Schwefel als Bariumsulfat bestimmt. Die Ergebnisse werden in Tabelle IV. zusammengezeigt.

TABELLE IV.

Versuchs-Nr.	Menge des Materials (cem)	Gesamte Aschen Menge g.	K. g.	Na. g.	CaO. g.	MgO. g.	Cl. g.	Gesamt. S g.	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g.
I	100	0.9088	0.1949	0.2078	0.0172	0.0525	0.3030	0.0002	0.0007
II	100	0.9467	0.2173	0.2059	6.0287	0.0456	0.3302	0.0005	0.0008
Durchschnittl.		0.9277	0.2061	0.2068	0.0229	0.0490	0.3166	0.0003	0.0007

### 2. Organische Stoffe.

Der Appendixsaft wurde klar abfiltriert. Das Filtrat wurde auf Gesamt-N, Rest-N, Ammoniak, Harnstoff, Aminosäure, Kreatin und Kreatinin, und Harnsäure untersucht.

Der Gesamt-N wurde nach Kjeldahl, der Rest-N nach Enteisweissung mit Kolloidaleisen verbrannt. Der Harnstoff und Am-

TABELLE V.

Versuchs-Nr.	Nr. der verwend. Käminchen	Menge des verwend. Materials (cem)	Gesamt-N. mg%	Rest-N. mg%	Harnstoff-N. mg%	Amoniak-N. mg%	Aminosäure-N. mg%
I	326	5 cc. für G.-N.,	28.0	14.0	6.86	1.26	2.25
II	(328 330)	5 cc. für R.-N.,	30.8	21.0	3.08	2.52	3.36
III	(356 357)	5 cc. für U-N., +	56.0	42.0	6.16	3.64	4.33
IV	(360 362)	10 cc. für NH <sub>3</sub> -N., 10 cc. für Amino-N.	21.0	12.4	5.18	1.82	3.06
V	(370 373)		22.4	11.2	4.72	1.40	2.81
VI	(376 378)		19.6	14.0	2.80	1.96	0.88
VII	(380 384)		16.8	11.2	3.90	3.08	1.15
VIII	(390 396)		11.2	6.8	3.08	1.68	0.57
IX	(398 400)		16.7	10.2	5.04	0.56	1.48
X	(402 403)		11.6	5.6	3.36	1.96	0.59
Durchschnittl.			23.4	14.8	4.41	1.98	1.91

moniak wurde nach Van-Slyke und Cullen ermittelt. Die Aminosäure wurde mit der enteiweissten Lösung nach Van-Slyke behandelt. Die Resultate werden tabellarisch gezeigt (Tabelle V.).

Kreatin und Kreatinin wurden nach Pincussen (1930) colorimetrisch bestimmt. Dabei wurde der Appendixsaft zunächst mit Bleiessig gefällt, filtriert. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff behandelt, filtriert. Die Lösung wurde unter vermindertem Druck auf ein bestimmtes Volumen eingeengt, wodurch H<sub>2</sub>S verjagt wurde; dann erfolgte die Bestimmung auf Kreatin und Kreatinin (Tabelle VI.).

Die Harnsäure wurde nach Harpuder (1923) bestimmt. Die Menge der Harnsäure betrug durchschnittlich 0.28 mg% (Tabelle VII.).

TABELLE VI.

Versuchs-Nr.	Nr. der verwend. Kaninchen	Menge des verwend. Materials (cem)	Gesamt-Kreatinin mg%	Kreatinin mg%	Kreatin mg%
I	(400 402	50	0.17	0.13	0.05
II	(405 408	50	0.25	0.19	0.07
III	(410 415	50	0.26	0.20	0.08
Durchschnittl.			0.22	0.17	0.06

TABELLE VII.

Versuchs-Nr.	Nr. der verwend. Kaninchen	Menge des verwend. Materials.	Harnsäure
I	426, 428 429.	60 cem	0.34
II	430, 432 435, 438	100 cem	0.21
III	440, 442 444, 446	100 cem	0.29
Durchschnittl.			0.28

### III. FERMENTATIVE UNTERSUCHUNG DES APPENDIXSAFTES DES KANINCHENS.\*)

Dass die fermentative Wirkung im Appendixsaft existiert, erregt unser Interesse hinsichtlich der physiologischen Bedeutung des Appendix nicht wenig, weil es bedeutet, dass der Appendix an den Verdauungsvorgängen des Darmes beteiligt ist. Bis jetzt liegt keine solche Untersuchung mit Kaninchenappendixsaft vor.

Zur Untersuchung der verschiedenen Fermente wurden als Substrate 1% Dextrinlösung, 5% Traubenzuckerlösung, 2% Rohr-

\*) Vortrag auf der XXXVI. Tagung der Kyushu Med. Gesellschaft (Fukuoka, October, 1933).

zuckerlösung, 0,5% Maltoselösung, 1% Milchzuckerlösung, 1% Inulinlösung, 2% Harnstofflösung, Zellulose (0,1 g), Tributyrin und Eialbuminlösung verwandt. Bei den Versuchen wurde 1/3 molar Phosphatgemisch, aber bei Pepsinuntersuchung Kaliumchlorid-Salzsäuregemisch und bei Trypsinuntersuchung Borsäure-Natrongemisch als Pufferlösung gebraucht. Der abgespaltene Zucker wurde nach dem Bertrandschen Verfahren, das abgespaltene Ammoniak nach Van-Slyke und Cullen bestimmt, und zur Bestimmung des abgespaltenen Eiweisses wurde die Lösung mit Kolloidaleisen enteiweisst und nach Kjeldahl verbrannt. Die Versuchsrohre wurden sämtlich mit Toluol überschichtet, und standen steril im Brutschrank bei 37°–38°C so lange, wie die Digestion dauerte. Natürlich wurde jedesmal ein Kontrollversuch gemacht. Wie die Ergebnisse in der Tabelle VIII. zeigen, konnte ich im Kaninchenappendixsaft Amylase, Maltase und spurweise Invertase, dagegen glykolytisches Ferment, Trypsin, Pepsin, Zellulase, Laktase, Urease und Lipase nicht nachweisen. Die Resultate stimmen mit der Angabe von Strashesko, Berlazki und Ri im Hundappendixsaft fast gut überein. Aus den Ergebnissen scheint man schliessen zu können, dass der Appendixsaft keine bedeutende Rolle bei der Darmverdauung spielt.

TABELLE VIII.

Art des Ferments	Digestionsdauer	pH. der Pufferlösung	Vorhandensein oder Fehlen.
Glykolytisches Ferment	6 Tage	5.0	(-)
		5.5	(-)
		6.9	(-)
		7.4	(-)
Invertase	6 Tage	5.0	(+) spur
		5.5	(+) spur
		6.9	(-)
		7.3	(-)
Amylase	24 St.	6.0	(-)
		6.4	(+)
		7.4	(+)
		7.8	(+)
		8.0	(-)

Maltase	6 Tage	6.0 6.9 7.3	(+) (+) (±)
Inulase	6 Tage	2.9 4.6 5.9 6.3	(+) (-) (-) (-)
Trypsin	7 Tage	7.8 8.0 8.4 8.6	(-) (-) (-) (-)
Pepsin	7 Tage	1.2 1.4 1.8 2.2	(-) (-) (-) (-)
Urease	2 St.	5.2 6.2 7.1 7.7	(-) (-) (-) (-)
Cellulase	7 Tage	4.5 5.0 5.6 6.2	(-) (-) (-) (-)
Lactase	5 Tage	4.5 5.5 6.9 7.3	(-) (-) (-) (-)
Lipase	2 St.	6.1 6.4 7.1 7.8 8.2 8.5 8.8	(-) (-) (-) (-) (-) (-) (-)

## II. Kapitel. Chemische Zusammensetzung der Wurmfortsatzwandung.

Im vorigen Kapitel berichtete ich, dass der Appendixsaft verschiedene organische und anorganische Substanzen enthält. Nach meiner Ansicht muss dies so betrachtet werden, dass die Substanzen als Stoffwechselprodukte in der Appendixwandung in den Saft ausgeschieden werden. Wenn diese Ansicht richtig ist, muss

die chemische Untersuchung der Appendixwandung selbst im Vordergrund stehen, um die Biochemie bezüglich des Wurmfortsatzes zu verstehen. Ich untersuchte die Zusammensetzung der organischen Substanzen des Wurmfortsatzes des Kaninchens und des Hundes. Diese Kenntnisse mögen als Grundlage für das weitere Studium der Wurmfortsatzfrage dienen.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

Den Versuchstieren wurden die Wurmfortsätze herausgenommen und in Schleimhautschicht und Muskelschicht abgeteilt und in Alkohol getaucht, bis das Material zur Untersuchung langte.

Aus dem Alkoholextrakt der beiden Portionen wurde das Cholin als Cholinplatinat isoliert. Zur Isolierung der Monoaminoäuren wurde das Material mit konz. Salzsäure hydrolysiert und nach Fischer verestert, fraktioniert destilliert und verseift. Die einzelnen Aminosäuren wurden als Kupfersalze voneinander getrennt. Zur Isolierung der Hexonbasen wurde das Material mit Schwefelsäure hydrolysiert, nach Kossel und Kutcher bearbeitet (Tabelle IXa, IXb.).

TABELLE IX a.

Material	Zahl der verwend. Appendix	Gewicht des getrockn. Materials	Ausgangsmaterial (gr)	
			für HCl-Hydrolyse	für H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Hydrolyse
Kaninchen	Schleimhautschicht	180	92	60.0
	Muskelschicht	200	69.2	48.0
Hund	Schleimhautschicht	140	64.7	34.7
	Muskelschicht	120	192.6	50.0

In Hinsicht der quantitativen Verteilung der Proteinbausteine sind Lysin und Phenylalanin in der Schleimhautschicht, und Glykokoll und Valin in den beiden Schichten relativ reichlich beim Kaninchen vorhanden. Beim Hunde befinden sich Glutaminsäure in der Muskelschicht, Serin, Alanin und Valin in der Schleim-

TABELLE IX b.

Material Amino säure u.s.w g. %	Kaninchen			Hund		
	Schleim- haut schicht	Muskel- schicht	Durch- schnittl.	Schleim- haut schicht	Muskel- schicht	Durch- schnittl.
Cholin	1.03	0.68	0.85	0.27	0.11	0.19
Humin	3.31	8.76	6.03	6.14	1.20	3.67
Purin-N.	0.26	0.37	0.31	0.24	0.37	0.30
Lysin	9.07	1.07	5.07	3.85	3.52	3.68
Arginin	2.64	1.01	1.82	3.67	3.87	3.77
Histidin	0.02	0.02	0.02	0.32	0.08	0.20
Tyrosin	1.85	1.41	1.63	1.49	1.68	1.58
Glutaminsäure	0.34	vorhanden	0.17(+)	0.48	5.59	3.03
Glykokoll	5.39	4.04	4.71	2.49	2.06	2.27
Prolin	0.62	1.84	1.23	1.56	0.77	1.16
Alanin	0.48	0.68	0.58	3.67	0.15	1.91
Leucin	0.32	0.83	0.57	0.28	0.77	0.52
Valin	3.05	4.21	3.63	3.83	1.53	2.68
Isoleucin	0.58	0.28	0.43	0.28	0.34	0.31
Phenylalanin	5.36	1.36	3.36	2.39	0.28	1.33
Asparaginsäure	0.19	0.14	0.16	0.38	0.18	0.28
Serin	2.28	2.91	2.59	9.45	1.14	5.29

hautschicht, und Lysin und Arginin in den beiden Schichten relativ reichlich. Cholin, welches als Hormon für die Darmbewegung angesehen ist, befindet sich relativ reichlich in der Kaninchenhautschicht, während es im Hundappendix nur wenig existiert. Glykokoll ist vorwiegend reicher im Kaninchenappendix als im Hundappendix. Vor kurzem untersuchte Ikeyama (1935) die chemische Zusammensetzung der Magenwand des Hundes. Glutaminsäure, Lysin, Arginin, Phenylalanin, Alanin und Valin sind in der Magenwand des Hundes enthalten. Im Wurmfortsatz des Hundes wurden sie auch relativ reichlich ge-

funden, ebenso wie im Magen.

Zum Schlusse sei es mir gestattet, Herrn Prof. Dr. M. Tsudji, sowie Herrn Prof. Dr. Y. Sendju für ihre liebenswürdige Unterstützung meinen besten Dank auszudrücken.

#### LITERATUR.

Babkin, B. P., (1928): Die äussere Sekretion der Verdauungsdrüsen, 2 Aufl., 796–799.  
Berlazki (1903): Zit. nach Babkin.  
Ellenberger, W., (1906): Arch. für Anat. und Physiol., 137.  
Funke (1858): Zit. nach Sprengel in Deutsche Chirurgie Lfg. 46 d. Appendicitis, 48.  
Heile, B. (1914): Beiträge zur klinisch. Chirur., 93, 520.  
Harpuder, K. (1923): Ztschr. für die gesamt. exp. Medizin., 32, 378.  
Ikeyama, K. (1935): The Journal of Biochemistry., 22, 397.  
Meisel (1904): Deutsch. Med. Woch., 264.  
Mac Ewen, W. (1904): Lancet, 2, 995.  
Ochi, S. (1928): Folia Enderinologica Japonica, 4, 197.  
„ „ (1932): Die neueste Hormontheorie von Dr. Ochi, 8 Aufl. 167.  
Pineussen, L. (1930): Mikromethodik von Pineussen. 5 Aufl. 162.  
Ri, C. R. (1930): The Journ. of the Chosen Med. Assoc., 20, 1017.  
Strashesko (1904): Zit. nach Babkin.  
Seobolew (1903): Arch. für mikrosk. Anatomie, 62, 122.  
Ustjanzew, W. und Zunz (1905): Arch. für Anat. u. Physiol. (Physiol. Abteilung) 403.



檢印



## CONTENTS TO VOLUME 23.

No. 1, January, 1936.

	Page
TAMAI, Masamitsu. Studies on peroxidase .....	1
SMORODINZEW, I. A. und K. W. BEBESCHIN. Beiträge zur Chemie der Heminthen Mitt. III. Die chemische Zusammenstzung des Taenia Sodium .....	19
SMORODINZEW, I. A. und N. W. NIKOLAJEWA. Zur Frage über den Chemismus des Rigoris Mortis .....	27
NAGAYA, K., YAMAZOE, S. and NAKAMURA. Glyoxalase and its Co- enzyme. II. On kidney glyoxalase .....	41
SUZUKI, Yoshinosuke. Über die Leberasparaginase .....	57
MURAO, Shizuo. Experimentelle Untersuchungen über das Auftreten der Rachitis. Das Auftreten der Rachitis bei Gallosterin als Lieferquelle des Vitamin A und normaler Proportion des Phosphor- und Calcium- gehalts der gebrauchten Salzmixtur .....	71
YOSHIMURA, Hisato. Studies on the nature of the glass electrode potential. I. ....	91
NAGAOKA, Hiroshi. On the buffering power of haemoglobin denatured by heat .....	101
ITOJI, Ryoji. Spectroscopic studies on purified enzymes. II. Report. On amylase and peroxidase .....	125
KITSUGAWA, Kenichi. Durchblutungsversuche des Magens. XIII. Mit- teilung. Durchblutungsversuche des Magens mit Ornithin und mit Citrullin .....	131
SASAKI, Takaoki und OTSUKA, Ichiro. Über die d, l-Tolylalanin und ihren bakteriellen Abbau .....	139
SUMIDA, Seiichi. Beiträge zur Kenntnis der Biochemie des Wurm- fortsatzes .....	147